



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO DE LA
REPÚBLICA (PROPAC)
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**“DISEÑO DE UN RECUBRIMIENTO COMESTIBLE ANTIMICROBIANO
UTILIZANDO QUITOSANO Y PROTEÍNA DE CHÍCHARO ENTRECruzADA
CON TRANSGLUTAMINASA”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Presenta:

IBQ Astrid Saraí García Tarabay

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Octubre 2017



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**“DISEÑO DE UN RECUBRIMIENTO ANTIMICROBIANO UTILIZANDO
QUITOSANO Y PROTEÍNA DE CHICHARO ENTRECruzADA CON
TRANSGLUTAMINASA”**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Ciencia y
Tecnología de Alimentos

Presenta:

IBQ. Astrid Saraí García Tarabay

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

SINODALES

Dr. Carlos Regalado González
Presidente

Dr. Prospero Di Piero
Co-Director

Dra. Blanca Estela García Almendárez
Vocal

Dra. Monserrat Escamilla García
Suplente

Dr. Aldo Amaro Reyes
Suplente

M.S.P. Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma

RESUMEN

La creciente demanda de los consumidores por alimentos más naturales y el interés por proteger el ambiente, han impulsado el diseño de recubrimientos comestibles. La incorporación de agentes antimicrobianos retarda el deterioro de los alimentos. La nisina (N) ha sido ampliamente aprobada para su uso en alimentos. El entrecruzamiento de proteína de chícharo (PC) con transglutaminasa (TG), en mezcla con quitosano (QT), en presencia de sorbitol (S) puede mejorar las propiedades mecánicas y de barrera de los recubrimientos a base de estos polímeros. El objetivo de este trabajo fue determinar las propiedades mecánicas, fisicoquímicas y antimicrobianas de un recubrimiento comestible activo, basado en QT y PC entrecruzada con transglutaminasa. Se realizó un diseño factorial 2^3 ; los factores fijos fueron PC y S. Los factores variables fueron QT, TG y N, con los niveles: ausencia y presencia. Las variables respuesta fueron: potencial ζ , tamaño de partícula, índice de polidispersión (IP), ángulo de contacto, espesor, fuerza de tensión (FT), elongación (E), módulo de Young (MY), permeabilidad al CO_2 , O_2 y H_2O . Se realizó la caracterización fisicoquímica de las suspensiones filmogénicas (SF). Posteriormente se determinaron las propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas, y se estudió la biodegradabilidad de las películas. Se aplicó el recubrimiento activo a rebanadas de jamón inoculadas con 10^5 UFC/g de *Brochotrix thermospacta* (BT), monitoreándose su población, la de bacterias ácido lácticas (BAL) y cuenta bacteriana total (CBT) durante un mes. La adición de N afectó significativamente ($p < 0.05$) el potencial ζ , el tamaño de partícula y el índice de polidispersión (-17.71 ± 1.62 mV; 184.78 ± 16.86 nm; 0.325 ± 0.086 , respectivamente) mostrándose la mejor estabilidad de la SF en ausencia de N. La adición de TG aumentó la FT y disminuyó el MY de manera significativa, aunque el porcentaje de E fue similar. La permeabilidad al CO_2 $\{3.08 \pm 0.69 [(\text{cm}^3)(\text{m})] / [(\text{m}^2)(\text{d})(\text{kPa})]\}$ y O_2 $\{0.09 \pm 0.02 [(\text{cm}^3)(\text{m})] / [(\text{m}^2)(\text{d})(\text{kPa})]\}$ fue menor en las películas que contenían TG, mientras que la permeabilidad al vapor de agua se mantuvo sin diferencia. Por otro lado, la presencia de TG disminuyó ~19% el efecto antimicrobiano de las películas. Se logró reducir 0.5 log UFC/g la población de BT a los 7 d. La población de BAL no se modificó y la CBT se redujo 1 log después de 14 d. Se observó la desintegración de las películas después de 28 d, comprobando su naturaleza biodegradable. Se recomienda aumentar la concentración de nisina para controlar el crecimiento de los microorganismos deterioradores.

Palabras clave: recubrimientos comestibles, proteína de chícharo, nisina.

SUMMARY

Growing consumer demand for more natural foods and interest in protecting the environment has fueled the design of edible coatings. The incorporation of antimicrobial agents retards the deterioration of food. Nisin (N) has been widely approved for use in food. Crosslinking of pea protein (PC) with transglutaminase (TG), in admixture with chitosan (QT), in the presence of sorbitol (S) can improve the mechanical and barrier properties of coatings based on these polymers. The objective of this work was to determine the mechanical, physicochemical and antimicrobial properties of an active edible coating based on QT and PC crosslinked with transglutaminase. A 2^3 factorial design was performed; the fixed factors were PC and S. Variable factors were QT, TG and N, with levels: absence and presence. Response variables were ζ potential, particle size, polydispersity index (IP), contact angle, thickness, tensile strength (FT), elongation (E), Young's modulus (MY), permeability to CO_2 , O_2 and vapour H_2O . The physicochemical characterization of the film-forming suspensions (SF) was carried out. Mechanical, barrier and antimicrobial properties were determined. The biodegradability of the films was studied for 28 days. The active coating was applied to sliced cooked ham inoculated with 10^5 UFC/g of *Brochothrix thermospacta* (BT), monitoring its population, and lactic acid bacteria (BAL) and total bacterial count (CBT) during one month. The addition of N significantly affected ($p < 0.05$) the ζ potential, particle size and IP (-17.71 ± 1.62 mV; 184.78 ± 16.86 nm; 0.325 ± 0.086 , respectively), showing the best stability of SF in absence of N. The addition of TG significantly increased the FT meanwhile MY decreased, although E was similar. The permeability to CO_2 $\{3.08 \pm 0.69 [(\text{cm}^3)(\text{m})] / [(\text{m}^2)(\text{d})(\text{kPa})]\}$ and O_2 $\{0.09 \pm 0.02 [(\text{cm}^3)(\text{m})] / [(\text{m}^2)(\text{d})(\text{kPa})]\}$ was lower in films that did not contain TG. While the permeability to H_2O remained unchanged. On the other hand, the presence of TG decreased $\sim 19\%$ the antimicrobial effect of the films. The population of the inoculated microorganism was reduced by 0.5 log CFU / g at day 7. The BAL population was not modified and CBT was reduced 1 log after 14 d. Disintegration of the films was observed after 28 d confirming their biodegradable nature. It is recommended to increase nisin concentration to control spoilage microorganism growth.

Key words: edible coatings, pea protein, nisin.

DEDICATORIA

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT, por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

Al Dr. Carlos Regalado, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo. Por compartir sus conocimientos, por apoyarme y guiarme durante todos mis estudios de maestría.

Al Dr. Prospero Di Pierro, por su aceptación para realizar la estancia en la Universidad de Nápoles. Por su guía, paciencia y valiosas aportaciones para la realización de este proyecto.

A la Dra. Blanca García, al Dr. Aldo Amaro y la Dra. Monserrat Escamilla, por sus consejos, correcciones y aportaciones que fortalecieron este trabajo.

A la Dra. Marilena Esposito, por su apoyo durante mi estancia en la Universidad de Nápoles.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, al Programa de Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química, a los doctores y personal administrativo, por su apoyo y facilidades otorgadas.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Biotecnología de la UAQ, y al personal del Grupo de Biotecnología, Bioquímica y Enzimología de la Universidad de Nápoles, por compartir su experiencia, por su ayuda y por su amistad.

| CONTENIDO | página |
|--|---------------|
| Resumen | i |
| Abstract | ii |
| Dedicatoria | iii |
| Agradecimientos | iv |
| Índice General | v |
| Índice de Figuras | viii |
| Índice de Cuadros | ix |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.1 Películas y recubrimientos comestibles | 3 |
| 2.1.1 Empaques y propiedades | 4 |
| 2.1.1.1 Barrera contra el ambiente | 4 |
| 2.1.1.2 Barrera contra el oxígeno | 6 |
| 2.1.1.3 Barrera contra los aromas | 6 |
| 2.1.2 Materiales | 7 |
| 2.1.2.1 Proteínas | 7 |
| 2.1.2.2 Proteína de Chícharo | 8 |
| 2.1.3 Empaques activos | 9 |
| 2.1.3.1 Quitosano | 12 |
| 2.1.3.2 Nisina | 12 |
| 2.2 Formación de complejos por transglutaminasa | 14 |
| 2.3 Caracterización fisicoquímica de suspensiones filmogénicas | 16 |
| 2.3.1 Potencial ζ | 16 |
| 2.3.2 Tamaño de partícula | 17 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 19 |
| 4. OBJETIVO GENERAL | 20 |
| 4.1 Objetivos específicos | 20 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS | 20 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.1 | Formación de película | 20 |
| 5.2 | Diseño experimental | 21 |
| 5.3 | Determinación de las propiedades de las películas elaboradas | 22 |
| 5.3.1 | Potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión | 22 |
| 5.3.2 | Ángulo de contacto | 23 |
| 5.3.3 | Espesor | 23 |
| 5.3.4 | Propiedades mecánicas | 23 |
| 5.3.5 | Microscopia electrónica de barrido (MEB) | 24 |
| 5.3.6 | Permeabilidad al O ₂ , CO ₂ y vapor de H ₂ O | 24 |
| 5.3.7 | Espectroscopía Raman | 25 |
| 5.3.8 | Propiedades antimicrobianas | 25 |
| 5.4 | Aplicación del recubrimiento comestible en jamón cocido | 26 |
| 5.4.1 | Preparación de muestras de jamón (inoculación y empaque) | 26 |
| 5.4.2 | Análisis microbiológicos | 27 |
| 5.4.3 | Análisis de pH | 28 |
| 5.5 | Biodegradabilidad de las películas | 28 |
| 5.6 | Digestibilidad <i>in vitro</i> | 29 |
| 5.7 | Análisis estadístico | 30 |
| 6. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 31 |
| 6.1 | Formación de película | 31 |
| 6.2 | Caracterización fisicoquímica de las suspensiones filmogénicas (SF) | 33 |
| 6.3 | Ángulo de contacto | 35 |
| 6.4 | Propiedades mecánicas | 37 |
| 6.5 | Análisis estructural por microscopía electrónica de barrido | 39 |
| 6.6 | Propiedades de barrera | 40 |
| 6.7 | Espectroscopía Raman | 42 |
| 6.8 | Propiedades antimicrobianas | 44 |
| 6.7 | Aplicación del recubrimiento antimicrobiano en jamón cocido | 48 |
| 6.8 | Biodegradabilidad | 54 |
| 6.9 | Digestibilidad <i>in vitro</i> | 58 |
| 7. | CONCLUSIONES | 60 |

| | |
|-----------------------|-----------|
| 8. REFERENCIAS | 61 |
| 9. APÉNDICES | 74 |

INDICE DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Funciones selectivas de películas y recubrimientos comestibles | 5 |
| 2 | Formación de entrecruzamientos de proteína, catalizados por la TG. A) Intra-molecular. B) Inter-molecular | 15 |
| 3 | Representación de la doble capa eléctrica y el potencial ζ | 16 |
| 4 | Diagrama general de elaboración de recubrimientos comestibles | 21 |
| 5 | Equipo Instron Universal | 24 |
| 6 | Películas comestibles a base de proteína de chícharo: quitosano (10:1), sorbitol (40% respecto a la proteína), nisina (668 UI/cm ²) y transglutaminasa (0.12 UI/cm ²) | 31 |
| 7 | Microscopía electrónica de barrido de superficie de películas de PC:QT+ N en presencia de TG (A) y ausencia de TG (B), 2.5kX | 39 |
| 8 | Espectro Raman de películas comestibles de proteína de chícharo con quitosano, adicionado con nisina, y con transglutaminasa | 43 |
| 9 | Propiedades antimicrobianas contra <i>M. luteus</i> en solución filmogénica (A) y película (B). | 44 |
| 10 | Monitoreo de A) <i>Brochothrix thermosphacta</i> ; B) Bacterias ácido lácticas C) Cuenta bacteriana total en rebanadas de jamón | 52 |
| 11 | Remoción de los trozos de papel filtro (A) y película de proteína de chícharo:quitosano y nisina (B) al finalizar la prueba de biodegradabilidad | 57 |
| 12 | Digestión gástrica <i>in vitro</i> en el tiempo (min), de película de proteína de chícharo, quitosano y nisina, bajo condiciones fisiológicas | 58 |

INDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Componentes activos naturales incorporados directamente en empaques de alimentos | 11 |
| 2 | Diseño factorial completo 2^3 | 21 |
| 3 | Escala para evaluar crecimiento de hongos durante prueba de biodegradabilidad | 29 |
| 4 | Potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión de los tratamientos | 34 |
| 5 | Ángulo de contacto para las suspensiones filmogénicas | 36 |
| 6 | Propiedades mecánicas de las películas de proteína de chícharo:quitosano con nisina y transglutaminasa | 38 |
| 7 | Determinación de permeabilidad al CO_2 , O_2 y H_2O , de las diferentes películas elaboradas en este trabajo | 41 |
| 8 | Propiedades antimicrobianas de la SF y las películas elaboradas en esta investigación | 46 |
| 9 | Propiedades microbiológicas y fisicoquímicas de las muestras de jamón | 50 |
| 10 | Biodegradabilidad de películas de proteína de chícharo:quitosano y nisina en ausencia de TG (T6) y presencia de TG (T8) | 56 |

1. INTRODUCCIÓN

Los empaques son una barrera que separa al alimento del ambiente. Su función principal es proteger a los alimentos reduciendo la exposición a factores de deterioro (microorganismos, oxígeno, agua) y evitando la pérdida de compuestos deseables (Otoni *et al.*, 2017).

Actualmente la mayoría de los empaques para alimentos están hechos a base de polímeros derivados del petróleo, pues poseen ventajas tales como: bajo costo, resistencia mecánica y versatilidad. Sin embargo, su uso indiscriminado ha contribuido a la acumulación de desechos sólidos de baja biodegradabilidad en los vertederos de residuos. Lo anterior ha impulsado la búsqueda de polímeros naturales que puedan ser utilizados como empaques comestibles (Villada *et al.*, 2007).

El diseño y aplicación de los empaques comestibles ha aumentado no solo debido al interés por proteger el medio ambiente, sino también por la creciente demanda de los consumidores por alimentos más naturales (Campos *et al.*, 2011). Los recubrimientos comestibles tienen un doble propósito: alargar la vida de anaquel de muchos productos alimenticios, y reducir el uso de embalajes de plásticos que contaminan el medio ambiente (Giosafatto *et al.*, 2014).

Los recubrimientos y películas comestibles principalmente deben tener dos componentes: una matriz basada en una bio-macromolécula (proteínas, lípidos, carbohidratos) capaz de formar una estructura cohesiva, y un solvente (generalmente agua). Por lo regular, se añade un plastificante para aumentar la flexibilidad y además se pueden combinar otros ingredientes para modificar y mejorar las propiedades físicas o funcionalidad de las películas (Janjarasskul y Krochta, 2010). Tal es el caso de la transglutaminasa (TG), una enzima que cataliza la formación de un enlace isopeptídico ϵ -(γ -glutaminil) lisina, entre glutaminas y lisinas de las proteínas. Este tipo de enlace se ha investigado para mejorar las propiedades físicas y biológicas de las proteínas de los alimentos (Mariniello *et al.*, 2014).

Adicionalmente, se ha reportado la incorporación de agentes antimicrobianos naturales a los recubrimientos para retardar el crecimiento microbiano en un alimento (Arredondo-Ochoa, 2013). Los antimicrobianos más comúnmente utilizados son: ácidos orgánicos, quitosano, algunos polipéptidos (nisina), el sistema lactoperoxidasa, extractos de plantas y sus aceites esenciales, entre otros.

La nisina, una bacteriocina obtenida de algunas cepas de *Lactococcus lactis* presentes de manera natural en la leche cruda y alimentos fermentados. Tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana, que incluye algunas bacterias Gram-positivas *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus*. Además, la nisina es termoestable, no tóxica y sensible a las proteasas digestivas. El uso de la nisina como conservante en alimentos ha sido generalmente reconocido como seguro (GRAS). Su uso está permitido en leche pasteurizada, queso, huevos líquidos y productos cárnicos (Cao-Hoang *et al.*, 2010). Para seleccionar un agente antimicrobiano, se debe considerar la eficacia contra el microorganismo objetivo y las posibles interacciones entre el agente antimicrobiano, los componentes del recubrimiento comestible y el alimento mismo. Estas interacciones pueden modificar la actividad del antimicrobiano y las características del recubrimiento, siendo éstas factores clave para el desarrollo de los recubrimientos antimicrobianos (Campos *et al.*, 2011).

Para este proyecto se utilizó aislado de proteína de chícharo (PC), quitosano (QT), transglutaminasa (TG), sorbitol (S) y nisina (N) para el diseño de un recubrimiento comestible antimicrobiano.

2. ANTECEDENTES

2.1 Películas y recubrimientos comestibles

Las películas y recubrimientos comestibles se han utilizado durante años con la finalidad de mantener la calidad y seguridad de los alimentos durante su transporte y almacenamiento (Pavlath y Orts 2009).

En la mayoría de los casos se han utilizado los términos película y recubrimiento de manera indistinta; ambos conceptos indican que la superficie de un alimento está cubierta por una delgada capa de un material de cierta composición.

Un recubrimiento comestible se define como una suspensión de grado alimenticio que se añade a un alimento por aspersion, barnizado o sumergido, la cual después de secarse forma una delgada capa sobre la superficie de un alimento (Sánchez-Ortega *et al.*, 2014). Debido a que son aplicados directamente sobre la superficie del alimento, generalmente los recubrimientos son vistos como parte final del producto (Han y Aristippos, 2005).

Por otro lado, una película se obtiene al verter una suspensión filmogénica (SF) de grado alimenticio sobre una superficie inerte, la cual después de secarse se pone en contacto con la superficie del alimento. Las películas pueden tener forma de sacos, envolturas, bolsas o cápsulas a través de un procesamiento posterior.

Las películas y los recubrimientos comestibles son una alternativa para extender la vida de anaquel del alimento, pues actúan como barreras al vapor de agua, oxígeno, dióxido de carbono, aromas, lípidos, y otros solutos (Quirós-Sauceda *et al.*, 2014). Además, pueden contener sustancias que inhiban microorganismos patógenos y de deterioro.

2.1.1 Empaques y propiedades

Los recubrimientos comestibles y las películas no pretenden sustituir materiales de embalaje tradicionales, sino proporcionar una barrera adicional para la conservación de alimentos. Además ayudan a reducir el costo y también la cantidad de envases utilizados tradicionalmente, otra ventaja adicional es que pueden ser vehículos de aditivos y nutrientes (Campos *et al.*, 2011).

Debido a que son tanto un embalaje y como un componente de los alimentos, las películas y recubrimientos comestibles deben cumplir estos requisitos: buenas cualidades sensoriales, estabilidad físico-químicas y microbiana, libres de tóxicos y seguros para la salud, no contaminante, usar procesos y materias primas de bajo costo, de preferencia renovables y biodegradables (Otoni *et al.*, 2017).

Los requerimientos de las películas y recubrimientos comestibles dependen de su aplicación y de las propiedades del alimento al cual sean aplicados. A continuación se mencionan las propiedades que se buscan en un empaque comestible.

2.1.1.1 Barrera contra el ambiente

La razón más común para el uso de películas y recubrimientos comestibles es controlar la transferencia de masa entre los alimentos y la atmósfera ambiente. La permeabilidad al vapor de agua (PVA) es una propiedad importante para la selección y adaptación de materiales comestibles para el embalaje.

En la Figura 1 presenta un esquema de las propiedades deseadas en los recubrimientos comestibles.

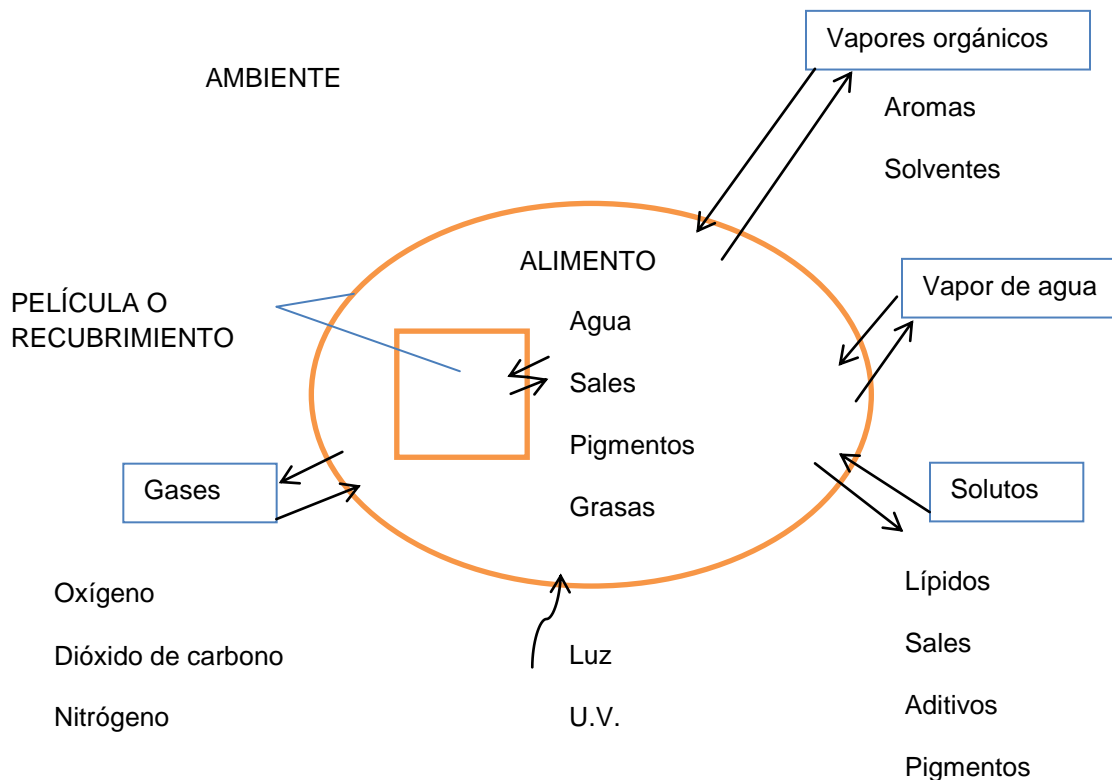


Figura 1. Funciones selectivas de películas y recubrimientos comestibles (adaptado de Janjarasskul y Krochta, 2010).

La PVA se define como la tasa de transmisión de vapor de agua por unidad de superficie de material plano de unidad de espesor inducida y por unidad de diferencia de presión de vapor entre dos superficies específicas, dadas ciertas condiciones de temperatura y humedad (Debeaufort *et al.*, 1998).

Mejorar las propiedades de barrera a la humedad representa uno de los retos principales en la elaboración de empaques y recubrimientos comestibles diseñados para su aplicación en alimentos frescos.

Al comparar la PVA de varios polímeros naturales, se hace evidente que es difícil producir un empaque o recubrimiento con una excelente tasa de permeabilidad a la humedad en comparación con los proporcionados por los plásticos convencionales. En consecuencia, actualmente los esfuerzos en la investigación se centran en resolver este problema, con la comprensión de que los

biomateriales a futuro deben ser capaces de imitar las características de barrera al vapor de agua de los materiales convencionales (Lacroix, 2009).

2.1.1.2 Barrera contra el oxígeno

Gran parte del deterioro de los alimentos se debe a la oxidación de los lípidos y de sus ingredientes, decoloración de la mioglobina en cortes de carne fresca, o pardeamiento enzimático de productos listos para consumir. Emplear recubrimientos comestibles con baja permeabilidad al oxígeno (PO) conserva la calidad y prolonga la vida útil de los alimentos sensibles al O₂, al mismo tiempo que reduce el uso de plásticos no reciclables usados como barrera para el O₂.

Además, el desarrollo de películas comestibles con determinada permeabilidad de gas en ciertas condiciones de almacenamiento, puede crear una atmósfera modificada. Suprimiendo con esto la tasa de respiración de productos hortícolas y / o la producción de etileno de productos climaterio fisiológicamente activa durante el almacenamiento y distribución (Janjarasskul y Krochta, 2010).

Las propiedades de barrera al O₂ y CO₂ dependen de muchos factores que incluyen la naturaleza del polímero, la presencia de plastificantes, la humedad ambiental y estructural de los materiales (Pérez-Gallardo *et al.*, 2012).

2.1.1.3 Barrera contra los aromas

Las barreras contra compuestos orgánicos volátiles son importantes en la prevención de la pérdida de sabor y aroma de los alimentos; mientras también se evita la migración de sabores desagradables externos durante el almacenamiento y la distribución.

En general, la eficacia de la barrera de los envases se optimiza cuando un compuesto tiene baja afinidad con los materiales y baja difusividad a través del polímero que compone la matriz. La hidrofiliidad de películas comestibles elaboradas con proteínas y basadas en polisacáridos hacen excelentes barreras contra los compuestos aromáticos no polares.

2.1.2 Materiales

Para la elaboración de películas y recubrimientos comestibles se han utilizado polímeros naturales dada su capacidad filmógena.

Tomando en cuenta el material, las películas comestibles pueden clasificarse en: hidrocoloides, lípidos y compositos. Las películas de hidrocoloides están compuestas de proteínas, derivados de celulosa, pectinas y otros polisacáridos. Las películas lipídicas están compuestas de ceras, acilgliceroles y ácidos grasos. Los compositos contienen una combinación de lípidos e hidrocoloides (Giosafatto *et al.*, 2014). Dependiendo de las características deseadas, los recubrimientos se pueden hacer usando un tipo de material o una mezcla de ellos, teniendo en cuenta sus ventajas y desventajas, como se menciona a continuación. (Colla *et al.*, 2006).

Los hidrocoloides son aptos para formar una matriz continua y cohesiva con propiedades mecánicas adecuadas. Tal capacidad está relacionada a la estructura química de estos compuestos, lo que permite la asociación de las cadenas poliméricas a través de puentes de hidrógeno (Bourtoom, 2009).

Las películas hechas a base de proteínas deben contener algún plastificante que induzca flexibilidad y evite la ruptura de las películas durante el secado o manipulación. La función general de los plastificantes es reducir las interacciones intramoleculares entre las cadenas de polímeros, lo cual incrementa el espacio de volumen libre y facilita el movimiento de las moléculas. Como consecuencia, la red polimérica se vuelve suave y flexible (Osés *et al.*, 2009).

2.1.2.1 Proteínas

Las proteínas comúnmente utilizadas para formar películas pueden ser de origen animal (caseína, colágeno, albúmina de huevo) o de origen vegetal (maíz, soya, trigo, cacahuate, arroz) (Sánchez-Ortega *et al.*, 2014).

Las películas a base de proteínas generalmente tienen buenas propiedades mecánicas además de ser buenas barreras contra el transporte de

O₂, CO₂, compuestos aromáticos y lípidos. Sin embargo, poseen una alta permeabilidad al vapor de agua.

Las propiedades de las películas de proteína se pueden mejorar mediante métodos químicos y enzimáticos, combinándolas con materiales hidrófobos o algunos polímeros, o utilizando un método físico (Bourtoom, 2009).

La capacidad de diferentes proteínas para formar películas y recubrimientos depende en gran medida de sus características moleculares: peso molecular, conformación, propiedades eléctricas (carga y pH), flexibilidad, y estabilidad térmica (Vargas *et al.*, 2009). Por otro lado, los polímeros tienen un alto potencial para formar enlaces intermoleculares que mejoran la resistencia mecánica de las películas (Janjarasskul y Krochta, 2010).

2.1.2.2 Proteína de Chícharo

El chícharo (*Pisum sativum* L.) es una fuente importante de proteínas vegetales y una posible alternativa a la soya. El aumento de la aceptación de las proteínas de chícharo se debe a sus múltiples cualidades tales como: buenas propiedades funcionales en aplicaciones alimentarias, alto valor nutritivo, la disponibilidad y costo relativamente bajo (Marinangeli *et al.*, 2009). Adicionalmente, la proteína de chícharo poseen la gran ventaja que tiene baja alergenicidad y no ha sido asociada a intolerancias alimentarias (Pérez *et al.*, 2016).

Los principales productores de chícharo a nivel mundial son China, India y Estados Unidos (FAO, 2015). México obtuvo una producción de 66,408.84 toneladas con una ganancia de \$ 418,739.98 miles de pesos (MXN) durante el 2015, según la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Entre los principales estados productores en nuestro país se encuentran México, Puebla, Baja California, Hidalgo y Sinaloa (SAGARPA, 2017). Aunque México no figura entre los principales productores, se tomó la decisión de utilizar la proteína de chícharo por las cualidades antes descritas.

Para el objetivo de este proyecto es de interés el contenido de proteína del chícharo. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus

siglas en inglés) recopiló los nutrientes proximales para 100 g de chícharo (Apéndice 1).

De acuerdo a Barac (2010), las principales proteínas de reserva del chícharo como legúmina (11S), vicilina (7S) y convicilina son globulinas. La legúmina es un hexámero con un peso molecular (Mw) ~320-380 kDa. Las proteínas maduras se componen de seis pares de subunidades que interactúan de forma no covalente. Cada uno de estos pares de subunidades consiste, a su vez, de una subunidad ácida de ~40 kDa y una subunidad básica de ~20 kDa, unidas por un único enlace disulfuro. Los tamaños de estos polipéptidos varían desde 38 hasta 40 kDa para los ácidos, y 19 a 22 kDa para los polipéptidos básicos.

La vicilina es una proteína trimérica de ~170 kDa que carece de residuos de cisteína y por lo tanto no puede formar enlaces disulfuro. La composición de vicilina de chícharo varía sobre todo a causa del procesamiento posterior a la traducción ribosomal. Principalmente la vicilina consta de subunidades de ~47 kDa, ~50 kDa, ~34 kDa y ~30 kDa.

Una tercera proteína de almacenamiento principal, llamado convicilina, tiene una subunidad de ~71 kDa y un peso molecular en su forma nativa de 290 kDa.

2.1.3 Empaques activos

Un empaque activo es definido como un sistema en el cual el producto, el empaque y el ambiente interactúan de manera positiva para extender la vida de anaquel o para alcanzar características que no se pueden obtener de otra forma (Malhotra *et al.*, 2015)

También ha sido definido como un sistema que cambia activamente las condiciones del empaque para extender la vida de anaquel, mejora la seguridad alimentaria y las propiedades sensoriales, mientras se mantiene la calidad del alimento. Los principales compuestos activos que pueden ser añadidos a los empaques son agentes antimicrobianos, antioxidantes, enzimas, sabores, entre otros (Yam *et al.*, 2005).

Actualmente, los consumidores prefieren los productos naturales sobre los sintéticos. Por esta razón, los agentes antimicrobianos de origen natural se están convirtiendo en importantes ingredientes de los empaques, ya que presentan un menor riesgo percibido por los consumidores (Irkin y Esmer, 2015).

Se han reportado varios estudios sobre la aplicación de agentes antimicrobianos naturales incorporados en la elaboración de empaques para retardar el crecimiento microbiano en un alimento; estos se conocen como empaques antimicrobianos (Arredondo-Ochoa, 2013).

El uso de empaques antimicrobianos tiene más ventajas comparado con la adición directa de los agentes antimicrobianos en los alimentos, debido a que los agentes antimicrobianos se difunden rápidamente en los alimentos y las sustancias activas pueden ser desnaturalizadas por los componentes del alimento con lo cual se reduce la efectividad de los antimicrobianos. Mientras que los empaques antimicrobianos ofrecen una migración lenta y continua del agente antimicrobiano desde el empaque hacia la superficie del alimento, con lo cual se mantiene una alta concentración del antimicrobiano por más tiempo (Sung *et al.*, 2013).

Los antimicrobianos más comúnmente utilizados son: ácidos orgánicos, quitosano, algunos polipéptidos (nisina), el sistema lactoperoxidasa, extractos de plantas y sus aceites esenciales, entre otros. El Cuadro 1 muestra algunos agentes antimicrobianos adicionados a empaques comestibles.

Para seleccionar un agente antimicrobiano, se debe considerar la eficacia contra el microorganismo objetivo y las posibles interacciones entre el agente antimicrobiano, los componentes de la película comestible y el alimento mismo. Estas interacciones pueden modificar la actividad del antimicrobiano y las características de la película, siendo éstas factores clave para el desarrollo de los recubrimientos antimicrobianos (Campos *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Componentes activos naturales incorporados directamente en empaques de alimentos (adaptado de Malhotra *et al.*, 2015)

| Compuesto activo | Polímero/ acarreador | Sustrato | Referencias |
|--------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------|
| Nisina | PE/HPMC | Medio de cultivo | (Sung <i>et al.</i> , 2013) |
| Aceite esencial de clavo | Proteína de merluza (<i>Merluccius capensis</i>) | Medio de cultivo | (Pires <i>et al.</i> , 2013) |
| Quitosano | Proteína de amaranto y ácido estéarico | Fresa (<i>Fragaria ananassa</i>) | (Colla <i>et al.</i> , 2006) |
| Extracto de semilla de toronja | Salvado de proteína de cebada: gelatina | Salmón | (Song <i>et al.</i> , 2012) |

PE: polietileno. HPMC: Hidroxi propil metil celulosa.

Los empaques antimicrobianos pueden ser preparados mediante la incorporación del agente antimicrobiano ya sea en el material de envasado, recubriendo el compuesto activo en la superficie de la película, o adicionando micro cápsulas en el empaque, a partir de las cuáles se libera el compuesto antimicrobiano durante el posterior almacenamiento.

Para la mayoría de los recubrimientos activos antimicrobianos se requiere contacto intenso entre el material de empaque y el producto alimenticio (Devlieghere *et al.*, 2004).

2.1.3.1 Quitosano

El quitosano (QT) es un polisacárido natural derivado de la desacetilación de la quitina [poli- β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-D-glucosamina], un componente mayoritario del caparazón de crustáceos como cangrejos, camarones). Se ha probado que el quitosano derivado particularmente del caparazón de los crustáceos es biodegradable, no tóxico, biocompatible y útil en el campo del empaque alimentos (Cé *et al.*, 2012).

El quitosano tiene actividad antimicrobiana contra hongos filamentosos, levaduras y bacterias (Kong *et al.*, 2010). El efecto antifúngico se debe a la supresión de la esporulación y la germinación de esporas (Hernandez-Lauzardo *et al.*, 2008). Por otro lado, el efecto antimicrobiano es debido a un cambio en la integridad de la membrana originado por interacciones entre el quitosano cargado positivamente y la carga negativa de la membrana celular de las bacterias. (Zivanovic *et al.*, 2005; Bautista-Baños *et al.*, 2006).

El quitosano con alto grado de acetilación ($\geq 75\%$) y peso molecular de 28 kDa a 1671 kDa ha mostrado los efectos antibacterianos más fuertes en soluciones acuosas sin importar el tipo de ácido usado para la solubilización (No *et al.*, 2002).

Las películas a base de QT tienen buenas propiedades mecánicas y permeabilidad selectiva a los gases CO₂ y O₂. Además, el QT es biodegradable y biocompatible con otros compuesto utilizados en películas (Jiang *et al.*, 2016).

2.1.3.2 Nisina

Las bacteriocinas son proteínas o péptidos sintetizados en los ribosomas de las bacterias, con actividad antimicrobiana (García *et al.*, 2010). De entre las bacteriocinas se encuentre la nisina, un péptido de 34 aminoácidos obtenido de algunas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Zhu *et al.*, 2015).

La nisina tiene actividad antimicrobiana principalmente contra bacterias Gram-positivas, y puede ser utilizada como agente antimicrobiano en películas comestibles (Rossi-Márquez *et al.*, 2009). Además, la nisina es termoestable, no

tóxica y sensible a las proteasas digestivas. Su uso como conservador de alimentos ha sido generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) (González-Toledo *et al.*, 2010).

El uso de la nisina está permitido en leche pasteurizada, queso y huevos líquidos, así como productos cárnicos (Cao-Hoang *et al.*, 2010). En México, de acuerdo a la Ley de Aditivos, está permitido el uso de nisina en quesos y productos cárnicos con un límite máximo de 12.5 mg/kg. En EUA, los límites varían dependiendo del producto. Por ejemplo, no se debe exceder el uso de 600 ppm de nisina en carne lista para su consumo y productos de pollo que contengan salsa; mientras en embutidos de carne cocida listo para su consumo no se debe exceder de 220 ppm (FSIS, 2017).

La solubilidad de la nisina varía en función del pH, cuando se emplea un pH = 2.2 la solubilidad es de 56 mg/mL, en pH= 5.0 es de 3 mg/mL, mientras que al emplear pH =11.0 la solubilidad es de 1 mg/mL (Liu y Hansen, 1990).

La molécula de nisina tiene un carácter anfipático; en el extremo amino-terminal contiene una proporción relativamente alta de residuos hidrofóbicos, mientras que el extremo carboxilo terminal es más hidrofílico. La nisina es una molécula catiónica debido a la presencia de tres residuos de lisina y dos residuos de histidina en la tipo A, y la ausencia de ácido glutámico y aspártico. Los valores de pKa de los residuos de histidina y lisina de la cadena lateral, son 6.5 y 10, respectivamente, y por lo tanto la carga neta de la nisina es dependiente del pH (Russell y Gould, 2003).

Aparte de la nisina A, se conocen 5 tipos de nisina; la nisina Z, F, y Q provienen también de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, mientras la nisina U y U2 provienen de *Streptococcus* sp. Su diferencia es debido a la posición de los aminoácidos, en el caso de la nisina A presenta una histidina en la posición 27 mientras que la nisina Z presenta una asparagina en la misma posición. Por su parte la nisina F también tiene asparagina en la posición 27 y una valina en la posición 30 (en lugar de Isoleucina como la nisina A). La nisina Q posee las dos sustituciones de la nisina F más otra dos sustituciones de valina en la posición 15

y leucina en la posición 21. La nisina U y U2 difieren de la Nisina A en 9 y 10 aminoácidos respectivamente, además de ser más corta por tres aminoácidos en comparación a las otras variantes (Piper *et al.*, 2011).

Recientemente se ha incrementado el uso de nisina en empaques antimicrobianos. Existen estudios que muestran que la nisina aplicada en películas y recubrimientos antimicrobianos puede controlar el crecimiento bacteriano, manteniendo la calidad de los alimentos, la seguridad y extendiendo la vida útil de los productos alimenticios (Irkin y Esmer, 2015).

Sánchez-Ortega *et al.* (2016) evaluaron la concentración de nisina (individual y en mezcla) que inhibía el crecimiento de *L. monocytogenes*, *M. Luteus* y *B. thermosphacta*; reportando que entre estos microorganismos, *L. monocytogenes* requiere la concentración más alta de nisina (6.25 µg/mL), para inhibir su crecimiento en medio semi- sólido.

La efectividad de los agentes antimicrobianos generalmente se reduce cuando se incorpora en recubrimientos activos, debido a la presencia de diferentes compuestos en comparación al ensayo con los agentes individuales o libres. Considerando lo anterior, Ochoa *et al.*, (2017) aumentaron la concentración del antimicrobiano entre 5 y 10 veces la concentración mínima inhibitoria.

La velocidad de difusión de nisina en una película al alimento, depende principalmente de tres factores: 1) las propiedades de la película (naturaleza de los polímeros, plastificante pH y temperatura) 2) características del alimento (pH, actividad de agua, concentración y tipo de iones) 3) condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad relativa, duración) (Gharsallaoui y Degraeve, 2016).

2.2 Formación de complejos por transglutaminasa

La fuerza de red de proteínas en una película, puede mejorarse si se emplea un agente reticulante o de entrecruzamiento, como la enzima transglutaminasa (TG).

El nombre sistemático de la TG es R-glutaminil-péptido: amina (γ -glutamyltransferasa (E.C. 2.3.2.13), lo que indica que la catálisis consiste en la transferencia de acilo de residuos gamma glutaminil, presente en las proteínas o sustratos peptídicos (donador de acilo), a un sustrato aceptor de acilo, lo que resulta en una variedad de diferentes productos en función de las moléculas involucradas (Rossi-Márquez 2011).

La formación de los enlaces isopeptídicos ϵ -(γ -glutaminil) lisina, entre los residuos de glutamina y lisina puede ser intra- o inter-moleculares (Figura 2).

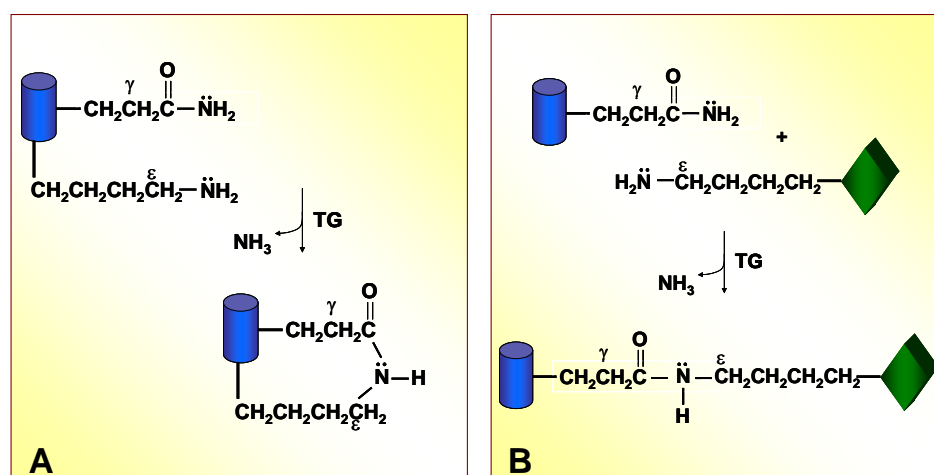


Figura 2. Formación de entrecruzamientos de proteína, catalizados por la TG. A) intra-molecular. B) inter-molecular

Debido a la formación de polímeros de alto peso molecular por acción de la TG en las películas comestibles, las propiedades mecánicas y de barrera de las películas se mejoran (Porta *et al.*, 2015).

La TG aislada del microorganismo *Streptovercillium* sp. no requiere iones calcio para actuar, mientras la actividad de la TG de origen animal se ve afectada por la concentración de iones calcio (Kieliszek y Misiewicz, 2014). En el presente trabajo se utilizará TG de origen microbiano.

2.3 Caracterización fisicoquímica de suspensiones filmogénicas

2.3.1 Potencial ζ

La carga de las micro y nano partículas es uno de los factores más importantes para determinar la estabilidad fisicoquímica de las emulsiones y suspensiones, y puede ser determinada al medir el potencial ζ (Sabbah *et al.*, 2016).

Para explicar el potencial ζ se debe hacer referencia a otros conceptos. Todas las partículas en suspensión tienen una carga neta en su superficie, la cual va a estar rodeada fuertemente por iones de cargas contrarias, esta capa es llamada capa “Stern” o capa fija, la que a su vez está rodeada de otra capa de iones de carga similar que están unidos de una forma menos fuerte, a esta capa se le llama “difusa”, por lo que se dice que las partículas cuentan con una doble capa eléctrica. El potencial ζ es la diferencia de cargas que existe entre la doble capa de Debye y el seno del líquido en que esta en suspensión (Figura 3).

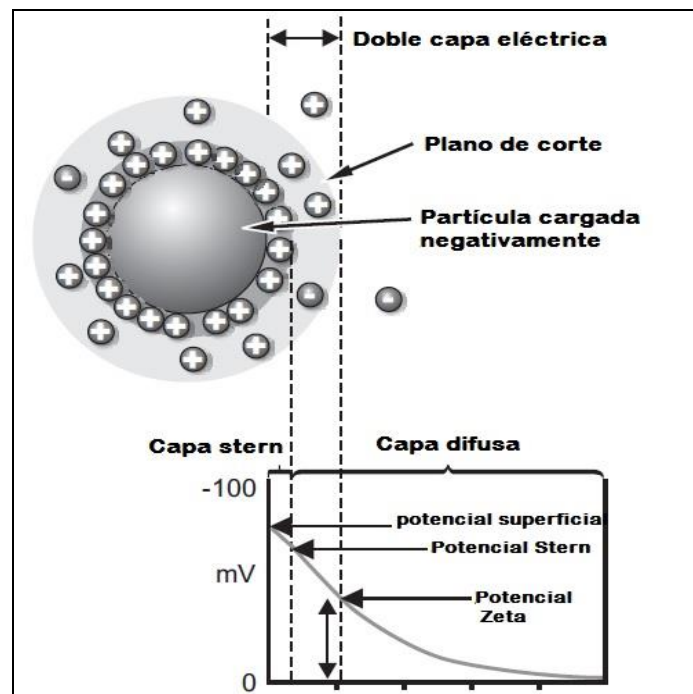


Figura 3. Representación de la doble capa eléctrica y el potencial ζ

La teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) propone que existen dos tipos de fuerzas que trabajan sobre la estabilidad de un sistema coloidal. Estas fuerzas son débiles y de corto alcance tal como las fuerzas de atracción de Van der Waals y fuerzas de repulsión electrostáticas que son fuertes y de mediano alcance. La combinación y equilibrio de estas fuerzas da principio a la estabilidad de los coloides. El potencial ζ es un indicador del alcance de la repulsión electrostática, por lo tanto un indicador de la estabilidad de dispersiones. Así que entre mayor sea la magnitud del potencial ζ mayor será la estabilidad del coloide (Salopek *et al.*, 1992).

La medición del potencial ζ se basa en la movilidad electroforética, la cual se define como el movimiento de partículas cargadas en suspensión mediante la influencia de un campo eléctrico externo. Estas partículas se mueven al polo opuesto a su carga, la velocidad con la que se mueven es proporcional a la magnitud de su carga, por lo tanto para poder calcular el potencial ζ es necesario medir la dirección y velocidad de estas partículas bajo un campo eléctrico externo. La técnica empleada es dispersión de luz dinámica y se basa en la medida de la velocidad de las partículas mediante velocimetría láser por efecto Doppler, en donde se hace pasar una fuente de luz a través de la muestra mientras se le aplica un ligero campo eléctrico, en el que se moverán las partículas y son analizadas por la técnica de dispersión dinámica de luz, tomando en cuenta la velocidad y dirección en que se mueven, con lo que se medirá la magnitud (de la velocidad) y dirección (signo de la carga) (Reyes-González, 2013).

2.3.2 Tamaño de partícula

Es una característica importante ya que influye en las características ópticas, reológicas y potencial de estabilidad. El tamaño de partícula en una suspensión se obtiene como un rango de tamaños distribuidos en la muestra, que es una medida de la distribución del tamaño predominante (McClements, 2011).

La dispersión dinámica de luz (DDL) es la técnica utilizada para medir el tamaño de las partículas dispersas en un líquido, en la región de sub-micras. La

DDL mide el movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de partícula. El movimiento browniano es el movimiento aleatorio de las partículas debido al bombardeo de las moléculas de solvente que las rodean. Las partículas grandes poseen un movimiento browniano lento, mientras que las partículas pequeñas se mueven rápidamente (Anónimo, 2004).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se produce una alta cantidad de empaques para alimentos. Estos empaques y embalajes son de plásticos derivados del petróleo, materiales que tardan años en degradarse, por lo cual se genera un grave problema de contaminación ambiental. Una alternativa a los empaques de plástico, son los “biopolímeros”; éstos son empaques comestibles, hechos de materiales naturales, de bajo costo y que no contaminan.

Dependiendo del material utilizado (proteínas, lípidos, polisacáridos) los empaques tendrán ciertas propiedades de barrera contra el oxígeno y el vapor de agua. Además, los empaques comestibles en esta investigación tienen el objetivo de alargar la vida de los alimentos, ya que pueden contener algún agente antimicrobiano que retrase o impida el crecimiento de bacterias deterioradoras. Por otro lado, también pueden inhibir bacterias patógenas de alimentos, con lo cual pueden contribuir a conservar la inocuidad de los alimentos.

Adicionalmente, hay una fuerte tendencia entre los consumidores de preferir los alimentos lo más natural posible, es decir sin tantos aditivos químicos añadidos. Por lo tanto, es necesario buscar estrategias que satisfagan las preferencias de los consumidores: alimentos naturales, pero que se conserven por más tiempo; empaques que protejan al alimento, pero que no contaminen; antimicrobianos que retrasen el deterioro y protejan la inocuidad de los alimentos, pero que no sean sintéticos.

Debido a lo anterior, resulta pertinente el diseño de un empaque comestible antimicrobiano, utilizando proteína de chícharo mezclada con quitosano y entrecruzada con transglutaminasa. Además, el empaque contendrá nisina, una bacteriocina de origen natural cuyo uso está permitido en alimentos. Se espera que el empaque tenga buenas propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas.

4. OBJETIVO GENERAL

Diseñar un recubrimiento comestible antimicrobiano utilizando quitosano y proteína de chícharo entrecruzada con transglutaminasa.

4.1 Objetivos específicos

1. Preparar suspensiones filmogénicas con proteína de chícharo, quitosano, sorbitol, transglutaminasa y nisina.
2. Caracterizar fisicoquímicamente las suspensiones filmogénicas.
3. Determinar las propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas de las películas.
4. Evaluar el efecto de las películas antimicrobianas en un alimento.
5. Determinar la biodegradabilidad y digestibilidad de las películas diseñadas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó aislado de proteína de chícharo (Roquette Naturalys S85F, México), quitosano (mediano peso molecular 375 kDa, desacetilación $\geq 75\%$ y alto grado de pureza, Sigma Aldrich) Sorbitol (Sigma Aldrich), enzima transglutaminasa microbiana derivada de cultivo de *Streptoverticillium* sp, con 92 UI/ g de aislado (Activa WM, Ajinomoto) y nisina comercial (MP Biomedicals) .

5.1 Formación de película

Para la elaboración de la película, se mezcló la solución de quitosano (2 % p/v disuelto en HCl 0.1M) con el volumen correspondiente de agua destilada, de acuerdo a la formulación. Esta mezcla se agregó a la solución de proteína de chícharo (2 % p/v, pH=12 con NaOH 1M) previamente preparada. Se adicionó el sorbitol (40 % p/p respecto a la proteína) y posteriormente se ajustó el pH a 7.5

con HCl 1 N. Se agregó la nisina a una concentración de 750 UI/mL de suspensión filmogénica SF) y la transglutaminasa (20 U/g de proteína). La mezcla se dejó en agitación constante durante una hora a temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$. Se reservó una porción de SF para su análisis en líquido y paralelamente se realizó el vertido de 50 mL de SF en cajas Petri (150 mm x 15 mm) que se incubaron en una cámara a 25°C y 45 % de humedad realtiva (HR) durante 48 h. Transcurrido ese tiempo las películas se despegaron cuidadosamente y se almacenaron para su posterior estudio (Figura 4).

Tomando en cuenta que el aislado protéico utilizado contiene el 65 % de proteína, se tiene una concentración final en la suspensión filmogénica de proteína de chícharo: 6.5 mg/mL; quitosano: 0.65 mg/mL; sorbitol: 2.6 mg/mL (40 % p/p respecto a la proteína); transglutaminasa: 0.13 UI/mL; nisina: 750 UI/mL).



Figura 4 Diagrama general de elaboración de recubrimientos comestibles

5.2 Diseño experimental

Se realizó un diseño factorial completo de 2^3 con dos réplicas. Los factores fijos fueron la cantidad de proteína de chícharo (PC) y el sorbitol (S). Los factores fueron el quitosano (QT), transglutaminasa (TG) y nisina (N). Los niveles de cada factor fueron ausencia (-) o presencia (+) (Cuadro 2).

Las variables de respuesta fueron: potencial ζ , tamaño de partícula, índice de polidispersión (IP), espesor, fuerza de tensión (FT), elongación (E) y módulo de Young (MY). A los que resultaron los mejores tratamientos se les determinó la permeabilidad a los gases y las propiedades antimicrobianas.

Cuadro 2. Diseño factorial completo 2³

| Tratamiento | QT | TG | N |
|-------------|----|----|---|
| T1 | - | - | - |
| T2 | - | - | + |
| T3 | - | + | - |
| T4 | - | + | + |
| T5 | + | - | - |
| T6 | + | - | + |
| T7 | + | + | - |
| T8 | + | + | + |

QT: quitosano; TG: transglutaminasa; N: nisina; - :ausencia; +: presencia.
 Nota: Todos los tratamientos contienen proteína de chícharo + sorbitol.

5.3 Determinación de las propiedades de las películas elaboradas

5.3.1 Potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión

El potencial eléctrico (potencial ζ), el tamaño de partícula y el índice de polidispersión se midieron con el equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Se realizaron tres mediciones de potencial ζ en cada muestra de SF (1mL) contenida en la cuveta de ensayo. La temperatura del análisis fue 25 °C y el voltaje aplicado fue 200 mV. El potencial ζ se calculó de la movilidad electroforética utilizando la ecuación de Henry y la aproximación de Smoluchowski. Se calculó el tamaño promedio de las partículas utilizando dispersión dinámica de luz incluyendo también la doble capa de partículas (diámetro hidrodinámico llamado promedio ζ). Mientras que el índice de polidispersión representa la varianza relativa en la distribución del tamaño de partícula. El equipo utiliza un láser de helio-neón con potencia de operación de 4 mW y fijado a $\lambda = 633$ nm de emisión roja (Porta *et al.*, 2016).

5.3.2 Ángulo de contacto

Para la medición del ángulo de contacto se colocó una gota (20 μ L) de la SF sobre una superficie de material semitransparente, flexible y resistente al agua (papel parafilm). Se tomaron fotografías y dichas imágenes se analizaron con el software Image J (National Institute of Health, Maryland, USA) con el paquete Drop Shape Analysis, basado en el algoritmo “B-spline snakes” (Stalder *et al.*, 2006).

5.3.3 Espesor

El espesor de la película se midió con un micrómetro modelo HO62 (Metrocontrol Srl, NA, Italia) en cinco posiciones aleatorias de la película (Giosafatto *et al.*, 2014).

5.3.4 Propiedades mecánicas

La fuerza de tensión, porcentaje de elongación, y el módulo de Young se midieron usando un equipo Instron Universal modelo 5543A (Instron Engineering Corp., Norwood, MA, EUA) (Figura 5).

Se cortaron muestras de película en tiras de 10 mm de ancho x 5 cm de largo, que fueron equilibradas durante la noche a 50 ± 5 % de humedad relativa y 23 ± 2 °C.

Las propiedades de tensión se midieron de acuerdo con la norma ASTM D882-97 (1997) con modificaciones, utilizando el método de ensayo A, peso estático, velocidad de separación constante. La separación inicial de agarre fue de 40 mm, y la velocidad de separación de la cruceta fue de 10 mm/min en el modo de tensión (Giosafatto *et al.*, 2014; Porta *et al.*, 2016).



Figura 5. Equipo Instron Universal

5.3.5 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Se cortaron muestras de película de 10 mm² y fueron observadas con un microscopio electrónico de barrido EVO 50 Carl Zeiss AG (Göttingen, Alemania) en condiciones de alto vacío, con voltaje de aceleración de 10 kV, a una distancia de trabajo de 5.5 mm. Las muestras fueron recubiertas con oro en un ionizador Desk II, Denton Vacuum (Göttingen, Alemania) (Giosafatto *et al.*, 2014).

5.3.6 Permeabilidad al O₂, CO₂ y vapor de H₂O

Se determinó utilizando la técnica ASTM D3985-81 (1981) con modificaciones, utilizando un equipo Multiperm (Extrasolution, Pisa, Italia). La prueba se realizó por duplicado, acondicionando las muestras de las películas por dos días a 50 % HR antes de la medición. Se utilizaron máscaras de aluminio para reducir el área de las películas a 5 cm². La prueba se realizó a 25 °C y 70 % HR (Porta *et al.*, 2016).

5.3.7 Espectroscopía Raman

Las mediciones de espectroscopia Raman se realizaron utilizando un equipo LabRam HR800 (Horiba Jobin Yvon; Miyano Higashi, Kyoto, Japón) acoplado a un microscopio Olympus BX 41 con una resolución del objetivo de 100X y un detector de dispositivo acoplado refrigerado con un sistema Peltier y tres sensores de excitación lineal: un láser de estado sólido bombeado por diodo (DPSS) a 532 nm, He-Ne a 633 nm y un láser de diodo a 785 nm con potencia de salida de 43.4 mW, 86.3 mW y 56.7 mW, respectivamente.

Los espectros Raman se registraron usando una rejilla de 400 líneas/mm y una red de 785 nm de emisión láser. La resolución espectral fue de aproximadamente 2 cm^{-1} , y la calibración se determinó usando la línea de $520,5\text{ cm}^{-1}$ de silicio.

Las mediciones se realizaron a los números de onda de 200 cm^{-1} a 3200 cm^{-1} (temperatura ambiente). Los espectros fueron grabados aplicando un tiempo de exposición de 4-60 s y escaneando la muestra de 10 a 20 veces. Las adquisiciones de espectros se obtuvieron mediante el software LabSpec (Horiba Jobin Yvon) y editado utilizando el programa Spectograph 1.2.5 (Escamilla-García *et al.*, 2013).

5.3.8 Propiedades antimicrobianas

Se utilizó *Micrococcus luteus* NCIB 8166 como microorganismo de prueba por su alta sensibilidad a la nisina. El organismo se mantuvo en un tubo inclinado en el medio assay e incubado a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Posteriormente el crecimiento en el tubo inclinado fue suspendido con $500\text{ }\mu\text{L}$ de solución Ringer 1X y se ajustó absorbancia a 0.3 a una longitud de onda de 650 nm (BS 4020:1974).

Por otro lado, el medio de cultivo se fundió y se enfrió a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se agregó el 2 % v/v de una mezcla 1:1 de Tween 20 (Sigma Aldrich) y agua destilada estéril previamente mantenida a $48\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20-30 min. Se diluyó la suspensión de prueba del microorganismo 1 a 10 con solución salina y de esta dilución se añadieron 2 mL a cada 100 mL de medio fundido a $48\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se vació el medio inoculado en una caja Petri y se dejó gelificar. Después, se invirtieron las cajas y se almacenaron a 4 °C por una hora para facilitar el perforado de los pozos. Con la ayuda de un tubo perforador de acero (8 mm), se realizó el número de pozos necesarios (Rossi-Márquez, 2007).

Para la determinación de las propiedades antimicrobianas en las suspensiones filmogénicas, se colocaron 60 µL de las SF (por triplicado) dentro de cada pozo y se dejó secar hasta que todo el líquido se absorbiera en el agar. También se incluyó una curva de calibración de nisina en un rango lineal de 2 - 10 UI/mL para cuantificar la nisina de las SF (Apéndice 2).

En el caso de las películas, se cortaron círculos de 1.2 cm de diámetro (1.13 cm² de área) con ayuda del horador No. 6. Una vez cortados los círculos, se dejaron bajo luz UV para esterilizar las películas durante 30 min de cada lado. Los trozos de las películas se colocaron cuidadosamente en la superficie del agar. Posteriormente, las cajas se colocaron en una incubadora (ShellLab 1370 GX, OR EUA) a T=30°C durante 48 h (Santiago-Silva, *et al.*, 2009).

5.4 Aplicación del recubrimiento comestible en jamón cocido

5.4.1 Preparación de muestras de jamón (inoculación y empaque)

Se cortaron rebanadas de jamón tipo York de la marca MAGNIL® (10 g de peso con medidas de 5 cm x 10 cm x 2 mm espesor). Se prepararon 3 tipos de muestras: jamón (J), jamón + recubrimiento (JR), jamón + recubrimiento con nisina (JRN). Todas las muestras se inocularon con 100 µL de una suspensión bacteriana con 10⁷ UFC/mL de *B. thermosphacta* ATCC 11 509, distribuyendo la suspensión en la superficie con una varilla de vidrio estéril (Rossi-Márquez *et al.*, 2009). Las muestras se dejaron 5 min en una campana de flujo laminar hasta que el inóculo fue absorbido. Se repitió la operación inoculando el reverso de las rebanas de jamón, obteniendo una concentración final de 10⁵ UFC/g de jamón. Después de la inoculación las rebanadas de jamón se dejaron reposar 20 min en una campana de flujo laminar para permitir que las células se adhirieran a la superficie (Ye *et al.*, 2008).

Posteriormente, se adicionaron 100 μ L de solución filmogénica a JR y JRN. Para JR se utilizó la suspensión filmogénica T5 (proteína de chícharo + quitosano), es decir, el recubrimiento sin el antimicrobiano de interés para esta prueba. Para JRN se utilizó el tratamiento T6 (proteína de chícharo + quitosano + nisina). La concentración de nisina en el jamón, fue de 11.85 mg/kg, siendo la concentración máxima permitida en un producto cárnico de 12.50 mg/kg, de acuerdo a la Ley de aditivos en México.

Las muestras se empacaron al vacío en bolsas de plástico (Tilia FoodSaver, Rye, NY, USA), utilizando un empacador al vacío y se almacenaron a 4°C durante 28 d.

5.4.2 Análisis microbiológicos

Las muestras se analizaron a diferentes intervalos de tiempo (0, 10, 20, 30 y 45 d). Se transfirió asépticamente el contenido de las bolsas empacadas al vacío, a bolsas estériles WhirlPak (Modesto, California, USA) y se diluyó 1/10 en agua peptonada (Oxoid) al 0.1 % p/v.

Las muestras se mezclaron en un homogenizador peristáltico (Stomacker Lab-Blender, modelo 400, Cooke Laboratory Products, Alejandria, USA) a velocidad de 250 rpm durante un min y se elaboraron las diluciones seriales decimales en agua peptonada (Jofre y Garriga 2008, Ravishankar *et al.*, 2012).

La población de *B. thermosphacta* se estimó mediante cuenta total por extensión en superficie de agar selectivo (STAA). La composición por litro de este medio fue: 20 g de peptona, 13 g de agar, 7.5 g de glicerol, 2 g de extracto de levadura, 1 g de K_2HPO_4 , 1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 10 mL de suplementos selectivos STAA (0.5 g de sulfato de streptomina, 0.05 g de cicloheximida, 0.05 g de acetato de talio). Las muestras se incubaron toda la noche a 30°C antes del conteo (Rossi-Márquez *et al.*, 2009).

También se cuantificaron bacterias ácido-lácticas (BAL) por incubación en medio MRS a 30°C por 48 h y la cuenta bacteriana total (CBT) por vaciado en placa en el medio método estándar, incubando a 37°C por 24 h (Hernández-Hernández *et al.*, 2017).

5.4.3 Análisis de pH

El pH de las muestras de jamón se determinó mezclando las muestras con agua desionizada en una proporción 1:9, y utilizando un potenciómetro (Hanna Instruments, Woonsocket, USA). Para cada tratamiento, las mediciones se realizaron por triplicado (Sindelar *et al.*, 2007, Hernández-Hernández *et al.*, 2009).

5.5 Biodegradabilidad de las películas

Se estimó siguiendo la técnica ASTM G21, la cual se ha aceptado como una prueba estandarizada para evaluar la biodegradabilidad de materiales, utilizando cinco hongos que tuvieron a las películas como sustrato. Se colocaron círculos de película de 2 cm de diámetro, en cajas Petri que contenían agar enriquecido con sales minerales. La composición por litro de este medio fue: 15 g de agar papa dextrosa, 0.7 g de K_2HPO_4 , 0.7 g de KH_2PO_4 , 0.7 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0 g de NH_4NO_3 , 0.005 g de NaCl, 0.002 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.002 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ y 0.001 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$ (Shang, *et al.*, 2009).

Se añadieron 100 μ L de una mezcla de esporas en suspensión. Dicha mezcla contenía volúmenes iguales de suspensión de esporas de *Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, *Chaetomium globosum*, *Gliocladium virens* y *Aureobasidium pullulans*; todas a una concentración de $(1 \times 10^7 \pm 2 \times 10^3)$ esporas/mL). Las cajas se incubaron a 30 °C y 85 % HR durante 28 d. Durante este periodo se realizó una inspección visual del crecimiento de los hongos y se otorgó una calificación de acuerdo al Cuadro 3. Como control positivo se utilizaron círculos de papel filtro. Como control adicional se incluyó la evaluación de la biodegradabilidad de un trozo de película sin la mezcla de esporas. (Hanifi *et al.*, 2014).

Cuadro 3. Escala para evaluar crecimiento de hongos durante prueba de biodegradabilidad

| Observación del crecimiento* | Calificación/ Escala |
|--|----------------------|
| Ninguno | 0 |
| Trazas de crecimiento (<10 %) | 1 |
| Crecimiento ligero (10 % - 30 %) | 2 |
| Crecimiento mediano (30 % - 60 %) | 3 |
| Crecimiento abundante (60 %- completamente cubierto) | 4 |

* Corresponde a la porción de superficie de película cubierta por los hongos.

5.6 Digestibilidad *in vitro*

Se pesaron 10 mg de cada tipo de película y se adicionaron 1.2 mL de fluido salivar simulado (FSS, 150 mM NaCl, 3 mM urea, pH= 6.9). Posteriormente se adicionaron 1.5 mL de fluido gástrico simulado (FGS, 0.15 M NaCl, pH=2.5). Las muestras se incubaron a 37 °C, durante 10 min a 170 rpm en agitador orbital. Posteriormente se tomaron alícuotas de 100 µL y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se adicionaron 50 µL de FGS y 50 µL de pepsina al 1 % p/v. Las muestras se incubaron a 37 °C con agitación constante. La reacción de la pepsina se detuvo con una solución de NH₄HCO₃ 0.5 M, a diferentes intervalos de incubación (1, 2, 5,10, 20, 40 y 60 min). Se incluyó un control que se incubó durante 60 min sin la proteasa. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE al 12 % de acrilamida, utilizando geles prefabricados (Biorad, Hércules, California) (Romano *et al.*, 2016).

Se tomaron alícuotas de 30 µL de muestra, y se adicionaron 7.5 µL de amortiguador de muestra: 15 mM Tris-HCl, pH= 6.8, que contenía 0.5 % p/v, SDS, 2.5 % v/v de glicerol, 200 mM de mercaptoetanol y 0.003 % p/v de azul de bromofenol.

La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante (80 V por 2-3 h) y las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie R250. Se utilizaron estándares de bajo peso molecular como marcadores (Biorad) (Laemmli, 1970).

5.7 Análisis estadístico

Todas las pruebas se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar y se analizaron por comparación de medias usando la prueba de Tukey ($p < 0.05$) y el software JMP 8.0 (SAS Institute).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Formación de película

Se obtuvieron películas transparentes y ligeramente amarillentas (parámetro no determinado cuantitativamente); además resultaron flexibles y fáciles de manipular. En aquellos tratamientos que contenían quitosano se observan algunas zonas no homogéneas (Figura 6).

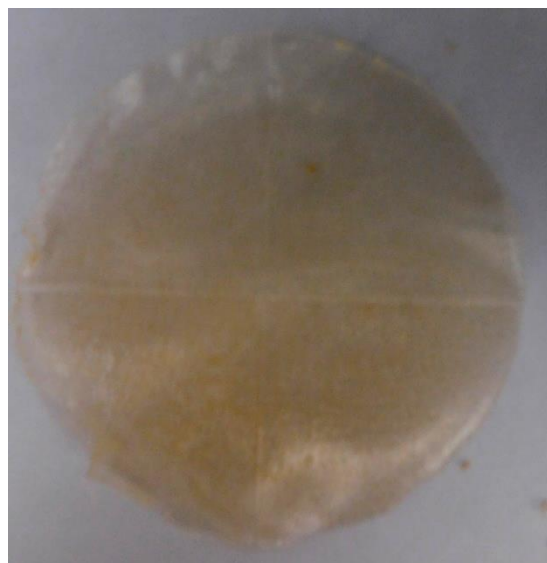


Figura 6. Película comestible a base de proteína de chícharo: quitosano (10:1), sorbitol (40% respecto a la proteína), nisina (668 UI/cm²) y transglutaminasa (0.12 UI/cm²).

Es importante elegir el tipo y la cantidad adecuada de plastificante, ya que su efecto puede modificar significativamente las propiedades mecánicas de los materiales obtenidos. Comúnmente, se utiliza sorbitol o glicerol en un rango de 0.2 g – 0.6 g por g de agente filmante (Osés *et al.*, 2009).

En pruebas preliminares se utilizó 40 % y 60 % de sorbitol, respecto a la cantidad de proteína y se midieron las propiedades mecánicas para evaluar el efecto del plastificante. Se observó que las películas que tenían más sorbitol presentaban menor fuerza de tensión y menor módulo de Young. Esto se atribuyó a que a mayor cantidad de moléculas de plastificante, hay más reducción de

interacciones proteína–proteína, por lo tanto la estructura de la película es más débil. Por otro lado, en la películas elaboradas no se observó diferencia significativa entre los porcentajes de elongación, como lo habían previsto Jongjareonrak *et al.* (2006). Kowalczyk *et al.* (2014) reportaron resultados similares al encontrado en este estudio al aumentar la cantidad de plastificante, por lo cual se decidió realizar los tratamientos con el 40 % de sorbitol.

En cuanto a la relación de de proteína:quitosano, se probaron dos relaciones: 10:1 y 4:1 Se tomó la decisión de seguir sólo con las de 10:1 ya que presentaron potenciales ζ más alejados de 0 mV, considerados en la literatura como valores más estables (Salopek *et al.*, 1992).

Además una película con menor cantidad de quitosano es más económica de elaborar, ya que el precio a nuestro laboratorio del quitosano con alto grado de desacetilación ($\geq 75\%$; Sigma-Aldrich) es de \$ 13,000 MXN/kg, mientras que el aislado de proteína de chícharo cotizado por la empresa Roquette Naturalys (75 % proteína b.s.; S85F) tiene un valor de \$ 500 MXN/kg.

Adicionalmente se estudiaron varios pH para la formación de las películas. Se determinó pH=7.5 para la elaboración de las películas de PC:QT (10:1) con nisina y transglutaminasa. A pesar de que la nisina presenta su mayor actividad antimicrobiana a pH ácido, no fue posible obtener películas con buenas propiedades a pH < 6. Durante las pruebas preliminares las películas obtenidas a pH < 6 resultaron frágiles y quebradizas. Por otro lado, se obtuvieron películas a pH=10 con buenas propiedades mecánicas, sin embargo, a pH básico la nisina presenta una mínima solubilidad por lo cual su liberación se vería disminuida. Un incremento en el pH al elaborar suspensiones filmogénicas, resulta en fuerza de tensión más grandes, y mejores porcentajes de elongación, en las películas hechas a base de proteínas de leguminosas. Sin embargo si las proteínas se forman a pH alcalino extremo, éstas tendrán un atributo sensorial a considerar (Kowalczyk *et al.*, 2014).

También se realizaron experimentos adicionando la TG “antes” y “después” de la nisina; ya que esta última tiene 3 moléculas de lisina en su estructura compuesta por 34 aminoácidos, y esto puede suponer una interferencia

para que la TG actúe sobre los residuos de lisina y glutamina de las proteínas. Se realizó un test de competición y se determinó que la nisina no es sustrato de la TG, por lo cuál la TG llevar a cabo el entrecruzamiento independiente de la presencia de N.

6.2 Caracterización fisicoquímica de las suspensiones filmogénicas (SF)

En el Cuadro 4 se listan las variables respuesta (potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión) correspondientes a la caracterización de las SF. De acuerdo al análisis de varianza (Apéndice 3), la nisina tiene un efecto significativo ($p < 0.05$) en estas variables ya sea de manera individual o en interacción con otros factores.

Se observa que los tratamientos en presencia de nisina (T2, T4, T6 y T8), poseen los valores absolutos más bajos de potencial ζ , así como una reducción en el tamaños de partícula y en el índice de polidispersión (IP). La carga de las micro y nano partículas es un factor determinante en la estabilidad fisicoquímica de las suspensiones y puede ser cuantificado al medir el potencial ζ . Cuando todas las partículas tienen un valor grande de potencial ζ , ya sea positivo o negativo, se repelen entre ellas y como consecuencia la suspensión será estable. Por el contrario, cuando el potencial ζ es cercano a cero mV, aumenta la tendencia a la floculación (Sabbah *et al.*, 2016).

En el Cuadro 4 todos los tratamientos poseen un potencial ζ en un rango de -16.06 a -23.67 mV. De acuerdo a la clasificación de Salopek *et al.* (1992), las suspensiones con potencial ζ en un rango de -16 a -30 mV, tienen baja estabilidad. Este efecto puede deberse a que la nisina tiene una carga neta positiva de +3.8 a pH=7, por lo cual los valores de potencial zeta tienden a ser más cercanos a cero en presencia de nisina, lo que concuerda con Russell y Gould (2003). También podría deberse a que la proteína tiene una carga neta positiva, y tiende a tener mayor repulsión con la nisina, evitando una buena interacción entre ambos.

Cuadro 4. Potencial ζ , tamaño de partícula e índice de polidispersión de los tratamientos

| Tratamiento* | Potencial ζ (mV) | Tamaño de partícula (nm) | Índice de polidispersión |
|--------------|------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| T1 | -23.67 \pm 0.23 ^c | 314.37 \pm 58.74 ^a | 0.735 \pm 0.073 ^a |
| T2 | -17.71 \pm 1.62 ^{a,b} | 184.78 \pm 16.86 ^b | 0.325 \pm 0.086 ^b |
| T3 | -22.15 \pm 0.97 ^c | 296.47 \pm 3.16 ^{a,b} | 0.535 \pm 0.011 ^{a,b} |
| T4 | -20.47 \pm 1.46 ^{a,b,c} | 192.68 \pm 33.16 ^{a,b} | 0.345 \pm 0.103 ^b |
| T5 | -22.05 \pm 2.05 ^{b,c} | 300.27 \pm 1.93 ^{a,b} | 0.595 \pm 0.118 ^{a,b} |
| T6 | -16.06 \pm 0.57 ^a | 213.73 \pm 35.18 ^{a,b} | 0.51 \pm 0.095 ^{a,b} |
| T7 | -22.18 \pm 0.74 ^c | 245.13 \pm 41.20 ^{a,b} | 0.59 \pm 0.093 ^{a,b} |
| T8 | -17.07 \pm 0.66 ^a | 187.03 \pm 14.24 ^b | 0.329 \pm 0.065 ^b |

*La descripción de los tratamientos se incluye en el Cuadro 2.

*Los resultados se reportan como la media \pm la desviación estándar.

*Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$)

Por otro lado, el potencial ζ del T1, que sólo contiene proteína de chícharo (PC), fue -23.67 \pm 0.23 mV y es menos negativo que lo reportado por Shevkani y Singh, (2015) (-44.2 mV). Lo anterior puede deberse a la concentración diferente de PC (2 mg/mL vs. 6.2 mg/mL) o al pH durante la determinación, ya que el potencial ζ es una característica de la partícula en el ambiente que la rodeada, y no de la partícula misma (Anónimo, 2004).

Se anexa un ejemplo de la determinación de potencial ζ y tamaño de partícula, arrojados por el equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). (Apéndice 4 y 5).

El tamaño de partícula, éste disminuyó en presencia de nisina, posiblemente debido a que la nisina reduce los espacios intermoleculares entre las proteínas y la transglutaminasa.

El índice de polidispersión (IP) es una medida de la homogeneidad del tamaño de partícula. Mientras más cercano a 1 sea el IP, la homogeneidad es menor. El valor más alto de IP se presentó en el tratamiento T1 (sólo contiene PC) debido a que la proteína de chícharo está compuesta por varias subunidades de diferentes tamaños (Barac *et al.*, 2010) y por lo tanto resulta más heterogénea. Los valores más bajos de IP se encuentran en presencia de los tres factores (T8) posiblemente debido a que la interacción triple QT*N*TG resulta en una distribución más homogénea del tamaño de partícula.

Otros autores también han caracterizado soluciones de nisina. Prombutara *et al.*, (2012) observaron un ligero incremento en el tamaño de partícula (159 ± 6.4 nm) y una disminución del potencial ζ (-28.3 ± 0.15 mV), al incorporar nisina en nanopartículas lipídicas sólidas.

Zohri *et al.* (2010) caracterizaron nanopartículas de quitosano/alginato cargadas con nisina, obteniendo un tamaño de partícula de 205 nm, IP=0.34 (relacionado a la homogeneidad de las partículas), y un potencial $\zeta = -47$ mV. Estos valores de tamaño de partícula e IP, están en concordancia con los valores presentados en el Cuadro 4.

6.3 Ángulo de contacto

El ángulo de contacto se define cómo el ángulo formado por la intersección de la interface líquido-sólido y la interface líquido-vapor (adquirido geoméricamente al aplicar una línea tangente desde el punto de contacto a lo largo de la interface líquido-vapor en el perfil de la gota).

Un ángulo de contacto menor a 90° (carácter hidrofílico) indica que la mojabilidad de la superficie es favorable, y el fluido se dispersará sobre el área superficial. Mientras que un ángulo de contacto mayor a 90° (carácter hidrofóbico)

generalmente significa que la mojabilidad no es favorable, y el fluido minimizará el contacto con la superficie, formando gotas compactas (Yuan y Lee, 2013).

Todos los tratamientos presentaron un ángulo de contacto menor a 90°, sin encontrar diferencias significativas (Cuadro 5). Ninguno de los factores (nisina, quitosano o transglutaminasa) presentes en las suspensiones filmogénicas afectó el ángulo de contacto.

Cuadro 5. Ángulo de contacto para las suspensiones filmogénicas

| Tratamiento | Ángulo de contacto ° | | |
|-------------|----------------------|---|-------------------|
| T1 | 85.40 | ± | 2.46 ^a |
| T2 | 82.23 | ± | 1.72 ^a |
| T3 | 81.33 | ± | 4.06 ^a |
| T4 | 82.97 | ± | 3.98 ^a |
| T5 | 84.37 | ± | 5.19 ^a |
| T6 | 74.50 | ± | 1.01 ^a |
| T7 | 80.57 | ± | 3.84 ^a |
| T8 | 81.43 | ± | 6.91 ^a |

*La descripción de los tratamientos se incluye en el Cuadro 2.

*Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar.

*Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$)

Los resultados indican que las suspensiones filmogénicas son de carácter hidrofílico, por lo tanto, podrían aplicarse a algún alimento de superficie hidrofílica (por ejemplo un producto cárnico) presentado buena mojabilidad.

Reyes-González (2013) determinó el ángulo de contacto de una suspensión de almidón oxidado en varias matrices alimentarias. En tomate rojo (una superficie lisa e hidrofóbica debido a las ceras) el ángulo de contacto fue 61.5°. En nuez (superficie rugosa, seca y rica en aceites) presentó un ángulo de

contacto de 40.5°. En carne de cerdo (superficie acuosa, irregular e hidrofílica) presentó un ángulo de contacto de 1.0°.

Posterior a la caracterización fisicoquímica, se seleccionaron algunos tratamientos (T2, T4, T6 y T8) para continuar con la caracterización de las películas. Dichos tratamientos tienen en común la presencia de nisina, por lo tanto el diseño factorial se reduce a 2².

La selección se realizó considerando que la presencia de nisina reduce el tamaño de partícula y el índice de polidispersión, sin afectar el ángulo de contacto. Por otro lado, a pesar de que la presencia de nisina impacta en la estabilidad fisicoquímica de las suspensiones filmogénicas (mostrando un valor absoluto de potencial ζ más bajo) se decidió utilizar dichas suspensiones mientras no se afectaran las propiedades antimicrobianas.

6.4 Propiedades mecánicas

Los tratamientos en presencia de QT (T6, T8) presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en cuanto a la fuerza de tensión (FT) requiriéndose de mayor fuerza longitudinal para romper estas películas. A su vez, los tratamientos en presencia de transglutaminasa (T4, T8) también presentan valores significativamente mayores ($p < 0.05$) de FT, en comparación con aquellos tratamientos que no contiene TG. Lo anterior está asociado a que la TG forma enlaces covalentes con las proteínas, por lo tanto las películas son más resistentes y se requiere aplicar más fuerza para romper estos enlaces (Cuadro 7).

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de elongación (E) (capacidad de los materiales para extenderse) debidas a la presencia de TG. Por su parte el módulo de Young (MY) indica la rigidez o flexibilidad del material (Di Pierro *et al.*, 2013). Los tratamientos en presencia de TG (T4, T8) poseen valores significativamente menores de MY ($p < 0.05$) que los tratamientos en ausencia de TG. Se observó que la película de PC+ N+TG presentó el valor más bajo de MY, siendo un 56% menor que el

tratamiento en ausencia de TG. Cuando las películas se prepararon en presencia de QT, la reducción del MY fue del 24% en el tratamiento que contenía TG, respecto al que no tenía. Los menores valores de MY en presencia de TG pudieran deberse a que el entrecruzamiento hace a las películas más flexibles.

La misma tendencia fue reportada en películas de yero, una leguminosa, en mezcla con pectina. En presencia de TG, sus resultados muestran una mayor FT, un aumento en E y una disminución en MY (Porta *et al.*, 2016).

Cuadro 6. Propiedades mecánicas de las películas de proteína de chícharo:quitosano con nisina y transglutaminasa

| Tratamiento | Descripción | Fuerza de tensión (MPa) | Elongación (%) | Módulo de Young (MPa) |
|-------------|-------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| T2 | N | 2.27 ± 0.18 ^b | 3.59 ± 1.01 ^b | 266.26 ± 6.04 ^b |
| T4 | N + TG | 2.61 ± 0.54 ^b | 7.88 ± 0.81 ^b | 117.46 ± 10.63 ^c |
| T6 | QT + N | 3.46 ± 0.19 ^{a,b} | 3.33 ± 0.21 ^b | 360.77 ± 35.09 ^a |
| T8 | QT + N + TG | 4.16 ± 0.20 ^a | 5.10 ± 1.51 ^b | 275.00 ± 12.77 ^b |

*Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar.

*Letras iguales indican que no existe diferencia significativa (p< 0.05)

Kowalczyk *et al.* (2014) obtuvieron películas de aislado de proteína de chícharo (con 4% de sorbitol, sin calentamiento y vaciado a pH=7) cuyas propiedades mecánicas fueron: FT= 6.48 MPa; E= 30.63%, y MY= 251.33 MPa. Por su parte, Pérez *et al.*, (2012) obtuvieron películas de proteína de chícharo con FT=3 MPa; E=70% y MY=50 MPa.

Las propiedades mecánicas de un polímero dependen del orden y orientación espacial de las macromoléculas, así como la estructura interna de las fases de los componentes (regiones amorfas y cristalinas). La cristalinización afecta el grado de plasticidad; por ejemplo, una mayor cristalinidad resulta en un polímero que es más rígido y menos flexible (Carragher, 2007). Por lo tanto las propiedades mecánicas también se ven afectadas por el tipo de plastificante utilizado.

6.5 Análisis estructural por microscopía electrónica de barrido

El conocimiento de la morfología es un parámetro importante para identificar cambios estructurales en las películas y para predecir su porosidad, permeabilidad, flexibilidad y resistencia.

Para observar si había cambios en la morfología de las películas debidos a la presencia de la TG o de la N, se realizaron análisis de la superficie de las películas elaboradas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Las micrografías muestran diferencias en la superficie de las películas. Las micrografías de los tratamientos que no contenían TG presentaron una superficie más heterogénea. Por el contrario, las películas que contenían TG presentaron en general una superficie más suave, continua y homogénea (Figura 7).

Estos resultados están en concordancia por lo reportado por Giosafatto *et al.* (2014) donde la presencia de la enzima TG en películas de faseolina modificada y pectina, fue responsable de una superficie más suave y compacta.

Es importante resaltar que en algunas zonas de la película, la estructura se mantuvo heterogénea, aun en presencia de la enzima, como se aprecia en esquina inferior derecha de la Figura 7B. Posiblemente lo anterior se debió a que no se llevó a cabo completamente el entrecruzamiento.

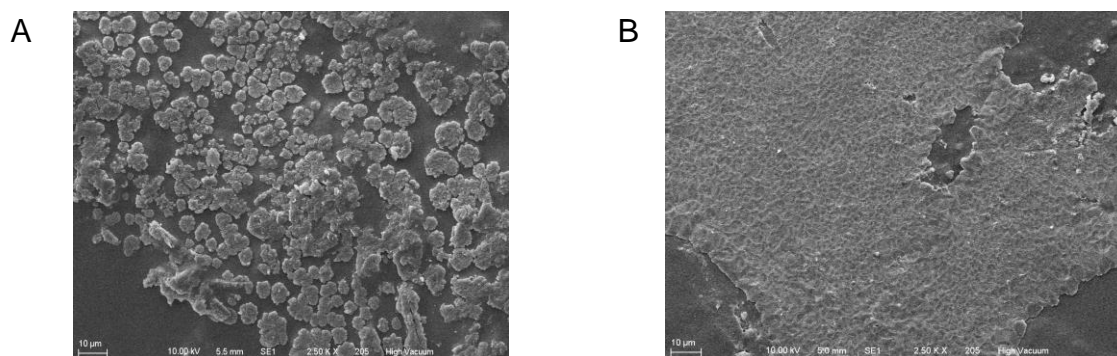


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido de superficie de películas de PC:QT+ N en presencia de TG (A) y ausencia de TG (B), 2.5kX

6.6 Propiedades de barrera

Los empaques de alimentos deben proveer una barrera contra los gases, sabor y aroma para mantener la calidad de los alimentos durante su vida anaquel. Generalmente, se presentan algunas limitaciones en la aplicación de empaques a base de proteínas y polisacáridos, debido a su alta sensibilidad a la humedad (Giosafatto *et al.*, 2014).

En este proyecto se consideró de interés evaluar el efecto de la N y la TG en las propiedades de barrera de las películas de PC:QT. La adición de N no tuvo efecto significativo en la permeabilidad a alguno de los gases. Resa *et al.* (2014) tampoco observaron diferencias significativas al adicionar N en películas de almidón de tapioca.

La adición de TG tuvo un efecto significativo en las propiedades de barrera, ya que la permeabilidad al CO₂ y O₂ de las películas disminuyó (3 y 250 veces respectivamente) cuando se adicionó TG (Cuadro 7). Estos resultados están en concordancia con las imágenes MEB de la superficie de las películas, ya que la TG se asocia a una estructura más compacta debido al entrecruzamiento y por lo tanto la permeabilidad a estos gases es menor.

Se destaca la baja permeabilidad al O₂ en las películas de PC:QT+N+TG. (8 veces menor que Mater-BI, película disponible comercialmente). La barrera al O₂ en las películas comestibles es sumamente relevante, ya que la presencia de O₂ en ciertos alimentos provoca reacciones que afectan el sabor, la calidad nutricional y la aceptabilidad. En cuanto al CO₂, algunos alimentos como frutas y verduras aumentan la producción de CO₂ y la alta concentración de éste dentro de los empaques puede resultar dañina para la vida de anaquel (Giosafatto *et al.*, 2014).

Cuadro 7. Determinación de permeabilidad al CO₂, O₂ y H₂O, de las diferentes películas elaboradas en este trabajo.

| Tratamiento | Espesor | CO ₂ | O ₂ | H ₂ O |
|-------------|-----------------------------|--|--|---|
| | μm | $\frac{\text{cm}^3 \cdot \text{mm}}{\text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{kPa}}$ | $\frac{\text{cm}^3 \cdot \text{mm}}{\text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{kPa}}$ | $\frac{\text{g} \cdot \text{mm}}{\text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{kPa}}$ |
| PC:QT | 120.00 ± 14.14 ^a | 9.60 ± 1.12 ^a | 24.18 ± 5.66 ^a | 0.21 ± 0.03 ^b |
| PC:QT+N | 121.00 ± 9.90 ^a | 8.59 ± 1.78 ^a | 20.82 ± 13.19 ^a | 0.24 ± 0.09 ^b |
| PC:QT+N+TG | 117.50 ± 10.61 ^a | 3.08 ± 0.69 ^b | 0.09 ± 0.02 ^b | 0.22 ± 0.02 ^b |
| Mater-BI* | 12.8 ± 0.6 ^b | 1.355 ± 0.01 ^b | 0.722 ± 0.02 ^b | 1.961 ± 0.01 ^a |

Letras iguales indican que no existe diferencia significativa (p < 0.05).

PC:proteína de chícharo; QT: quitosano; N: nisina; TG: transglutaminasa.

*Películas de almidón y poliéster biodegradable (poli- caprolactona) disponible comercialmente en Novamont Spa (Novara, Italia) (Di Pierro *et al.*, 2006)

Por otro lado, la permeabilidad al vapor de agua resultó similar en ambos casos. Estos resultados pueden ser explicados considerando que el efecto barrera al vapor de agua depende principalmente de la hidrofobicidad de la película, la cual no es afectada significativamente por el entrecruzamiento dentro de la matriz protéica.

Estos resultados están en concordancia con Porta *et al.* (2016), quienes reportaron una disminución en la permeabilidad al CO₂ y O₂ (20 y 300 veces respectivamente) en películas de proteína de yero (*Vicia ervilia*) en mezcla con pectina y entrecruzada de transglutaminasa; mientras la permeabilidad al vapor de agua no se modificó por la presencia de TG.

6.7 Espectroscopía Raman

Las interacciones químicas entre los componentes de las películas comestibles se evaluaron mediante espectroscopía Raman (Figura 8). El tratamiento T8 (PC:QT + N+ TG) mostró una disminución en la intensidad de las bandas a 940 cm^{-1} , 1203 cm^{-1} (ambas por la lisina) y 1448 cm^{-1} (glutamina) (Overman y Thomas, 1999; Escamilla-García *et al.*, 2013) en comparación a los tratamientos que no presentan TG, lo cual puede deberse a la formación de enlaces isopeptídicos por acción de la transglutaminasa. De este mismo espectro, la señal a 1203 cm^{-1} correspondiente a Lis desaparece en presencia de TG, mientras que se mantiene en los tratamientos T5 (PC:QT) y T6 (PC:QT + N). Lo anterior sugiere que el entrecruzamiento de la TG puede llevarse a cabo con los residuos de Lis y Gln ya sea de la proteína de chícharo o de la nisina.

Los resultados concuerdan con Taddei *et al.* (2013), quienes reportaron una reducción en la intensidad de las bandas a 940 cm^{-1} debido a un re-arreglo conformacional y a la presencia de TG en películas de fibroína y gelatina.

En la región de $1600 - 1700\text{ cm}^{-1}$ la banda más prominente corresponde al modo vibracional de la amida I, que se centra en 1665 cm^{-1} (Herrero *et al.*, 2011). Esta banda proporciona información sobre la estructura secundaria de las proteínas, la cual involucra estiramiento de C=O y C-N en menor grado, así como flexión de $C_{\alpha}-C-N$ y N-H en el plano de los péptidos (Kang *et al.*, 2017).

Se observó un ligero cambio de la máxima intensidad de la banda a 1657 cm^{-1} a números de onda más altos (1663 cm^{-1}) cuando se adicionó TG a las películas, indicando una reducción de la estructura α -hélice (Figura 8). Resultados similares fueron reportados por Kang *et al.* (2017), quienes observaron cambios en el espectro de salchichas adicionadas con TG, en las bandas correspondientes a amida I, atribuyéndolo a una reducción en la estructura α -hélice y un aumento en la estructura de hoja- β y vuelta- β . Debido a un incremento en los puentes de hidrógeno la mayoría de las estructuras α -hélice cambian a hoja- β durante la desnaturalización de proteínas en presencia de transglutaminasa (Perisic *et al.*, 2013).

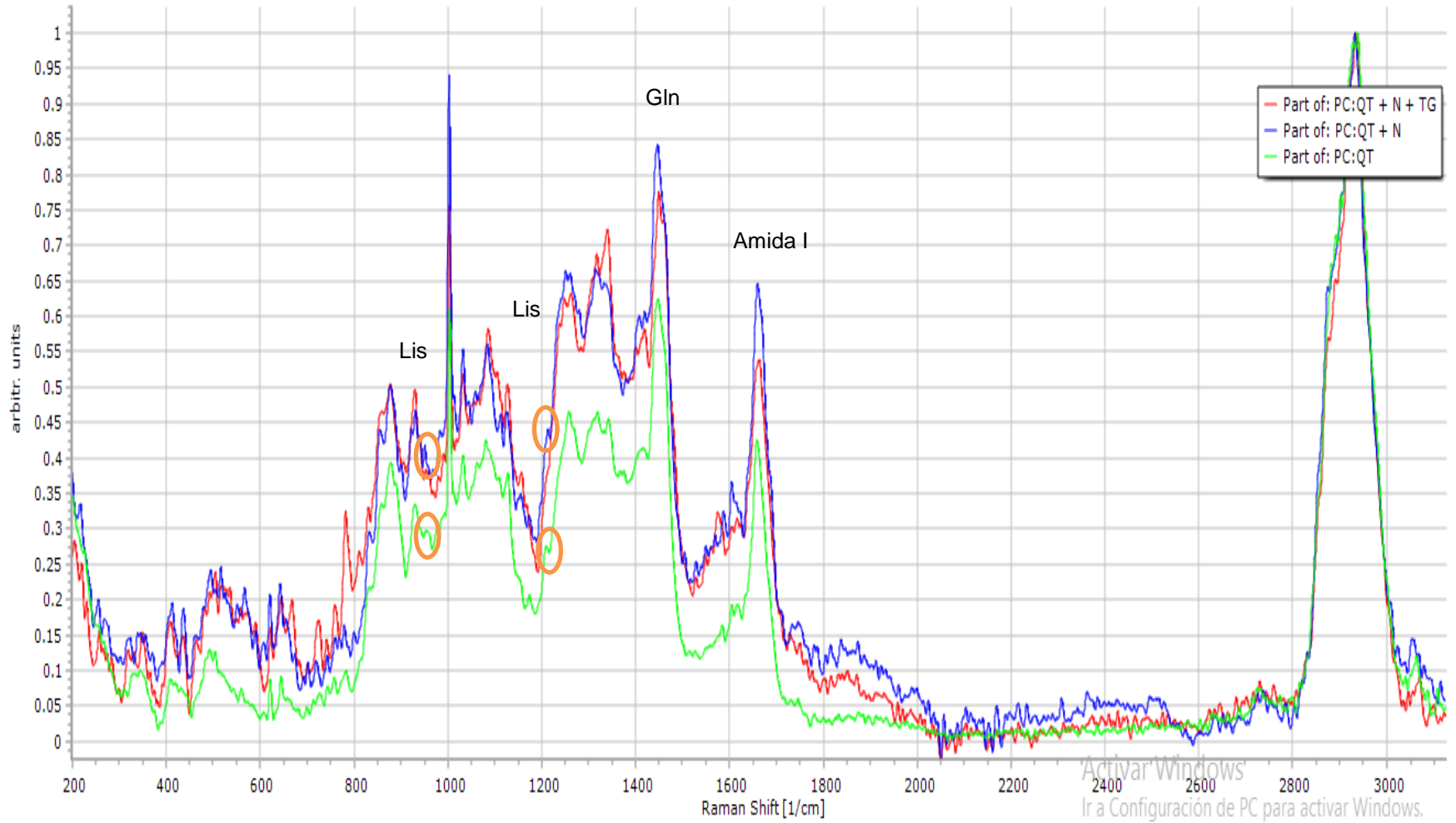


Figura 8. Espectro Raman de películas comestibles de proteína de chícharo con quitosano (verde), adicionado con nisina (azul) y con transglutaminasa (rojo).

Las señales de 780 cm^{-1} , 1336 cm^{-1} y 1571 cm^{-1} aparecieron solamente en el espectro del T8, por lo que posiblemente se deben a la transglutaminasa o bien una interacción de la TG con PC. Para comprobar lo anterior, se recomienda incluir un espectro de los componentes de la película de manera individual (PC, QT, N y TG).

6.8 Propiedades antimicrobianas

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión en agar y como microorganismo indicador a *M. luteus*. Sólo los tratamientos que contenían nisina (T2, T4, T6 y T8) presentaron actividad antimicrobiana. El resto de los tratamientos (T1, T3, T5 Y T7) se utilizó como control negativo. El experimento se realizó tanto en la solución filmogénica, como en película. (Figura 9, A y B, respectivamente.)

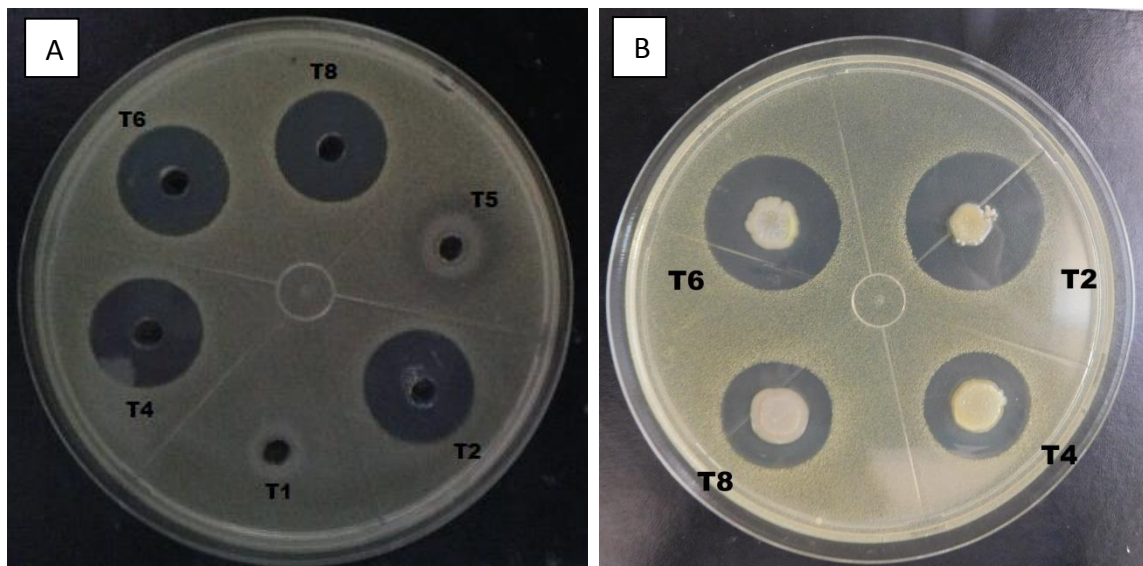


Figura 9. Propiedades antimicrobianas contra *M. luteus* en solución filmogénica (A) y película (B).

En la Figura 9 A se observan zonas de inhibición bien definidas provocadas por los tratamientos que contienen nisina (T2, T4, T6 y T8). Por el

contrario, no se presenta una zona de inhibición en la solución que solo contiene proteína de chícharo (T1). En el caso del tratamiento que contiene proteína de chícharo y quitosano (T5) se observa una ligera zona de inhibición, pero esta zona de inhibición no es significativa respecto a las zonas producidas por la nisina.

Al ser una bacteria Gram-positiva, *M. luteus* no es el microorganismo más sensible al quitosano. El efecto antimicrobiano es diferente para bacterias Gram-positivas que para bacterias Gram-negativas debido a las diferentes características de la membrana celular. Chung *et al.* (2006) reportaron una mayor actividad antimicrobiana del quitosano contra bacterias Gram-negativas en comparación con bacterias Gram-positivas.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Park *et al.* (2004), quienes demostraron la acción bactericida de películas de quitosano, contra bacterias Gram-negativas como *E. coli*, y muy poca inhibición de crecimiento contra bacterias Gram-positivas como *S. faecalis*.

Por otra parte, en la figura 9 B también se observan zonas de inhibición definidas en los tratamientos que contienen nisina (T2, T4, T6 y T8). De los cuáles, aquellos que contienen TG (T4 y T8) presentan zonas de inhibición más pequeñas que aquellas que no contienen TG, a pesar que tienen la misma cantidad de nisina (670 UI/cm²).

En suspensión filmogénica (SF), las zonas de inhibición no presentan diferencias significativas entre los tratamientos que contienen nisina (Cuadro 8). Al tratarse de una matriz líquida, fue posible cuantificar la nisina en SF utilizando la curva de calibración, obteniéndose 697 ± 33.23 UI/mL. Se mantuvo el $92.93 \pm 4.43\%$ de la actividad de la nisina respecto a la cantidad de nisina adicionada (750 UI/mL). Lo anterior puede deberse a que algunas moléculas de nisina quedan atrapadas entre los complejos de PC: TG y no se difunde totalmente. En este caso no tuvo efecto el pH, ya que la curva de calibración del estándar de nisina se elaboró bajo las mismas condiciones que las SF.

Cuadro 8. Propiedades antimicrobianas de las SF y las películas elaboradas en esta investigación.

| Tratamiento | Descripción | Zona de inhibición en SF ¹ (cm) | Zona de inhibición en película ¹ (cm) |
|-------------|-------------|--|--|
| T2 | N | 2.92 ± 0.02 ^a | 3.89 ± 0.10 ^a |
| T4 | N + TG | 2.95 ± 0.07 ^a | 3.07 ± 0.05 ^b |
| T6 | QT + N | 2.92 ± 0.02 ^a | 3.89 ± 0.16 ^a |
| T8 | QT + N + TG | 2.92 ± 0.02 ^a | 3.23 ± 0.18 ^b |

*Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar.

* Letras iguales indican que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$).

¹ La cantidad de nisina adicionada equivale a 45 UI en SF, y 757 UI en película

Por otro lado, en las películas se observó una diferencia significativa entre aquellos tratamientos que contenían TG y los que no, ya fuera en ausencia de QT (T2 y T4) o en presencia de QT (T6 y T8) (Cuadro 8). Los factores individuales N, TG y la interacción N*TG resultaron altamente significativos ($p < 0.0001$).

En películas, hubo una reducción ~19% de la actividad antimicrobiana en presencia de TG. Lo anterior puede deberse a una interacción a nivel molecular entre N y TG cuando la matriz es sólida (película). Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores, como se describe a continuación.

Sebti *et al.* (2003), elaboraron películas con nisina y determinaron su actividad antimicrobiana en presencia de hidroximetilpropilcelulosa (HPMC). Sólo se mantuvo el 55% de la actividad antimicrobiana. Probablemente, se formaron enlaces químicos entre la nisina y el HPMC o el ácido cítrico, por lo cual la nisina quedó retenida en la matriz de la película. Se pueden formar enlaces químicos entre la nisina y otros componentes de la película durante el calentamiento. El grupo amino primario de la posición N-terminal de los residuos de lisina podrían reaccionar con el grupo carboxilo disponible del ácido cítrico para formar enlaces

amida. Además el HPMC puede atrapar a la nisina por medio de enlaces éster del grupo carboxílico C-terminal de la nisina y el grupo hidroxilo de la celulosa. En ambos casos, la desorción de la nisina estaría fuertemente limitada, comprendiendo una bioactividad débil.

La nisina posee la habilidad para formar poros en las membranas de las bacterias; de esta manera se desacopla la fuerza protón motriz y el equilibrio del pH, causando la pérdida de iones y disminuyendo la capacidad de generar ATP para las funciones celulares, dando como resultado la muerte de las células. El segundo mecanismo de acción reportado, se ocasiona porque la nisina también interfiere con la biosíntesis de la pared celular, ya que se une a la molécula lipid II (precursor del peptidoglicano) y por lo tanto se tiene una pared celular debilitada que no soporta la presión osmótica de la célula (Breukink y de Kruijff, 2006).

Por su parte, la carga positiva del quitosano (en soluciones ácidas) interfiere con los residuos cargados negativamente de las macromoléculas en la superficie celular, y posiblemente compite con los iones Ca^{2+} por sitios electronegativos en la membrana; causando por lo tanto desestabilización de la membrana y provocando fugas de iones (Bégin y Van Calsteren 1999).

Al poseer diferentes mecanismos de acción, existía la posibilidad de que el quitosano tuviera un efecto antagónico sobre la nisina. Sin embargo, el efecto del QT fue indiferente ante el efecto antimicrobiano de la nisina.

Sivarooban *et al.* (2008), comprobaron el efecto antimicrobiano sinérgico entre la nisina y el extracto de semilla de uva contra *L. monocytogenes*, ya que ambos compuestos actúan sobre la membrana celular. Vásquez *et al.* (2009), reportaron que el sorbato de potasio y el almidón de tapioca (solos o en mezcla), presentan un efecto antagónico en la efectividad del quitosano para inhibir el crecimiento de *Lactobacillus* spp. Ellos sugieren que la acción antimicrobiana del quitosano se disminuyó por las interacciones con el almidón de tapioca y el sorbato de potasio, las cuáles reducen la disponibilidad de NH_3^+ para interaccionar con la membrana celular.

La película compuesta de quitosano y nisina, posee la ventaja que puede actuar contra bacterias Gram-positivas y negativas, ampliándose el espectro de aplicación. Por ejemplo, Park *et al.* (2004) probaron la efectividad de películas compuestas de quitosano y lisozima contra *E. coli* y *S. faecalis*.

Para asegurar que esto se cumple en el presente proyecto, se recomienda probar las propiedades antimicrobianas contra alguna bacteria Gram-negativa, en un trabajo posterior.

6.7 Aplicación del recubrimiento antimicrobiano en jamón cocido

Los productos cárnicos cocidos o curados como jamón, salchicha, paté son comercialmente importantes. Los niveles de consumo anual estimado de carnes frías es de 8 kg por persona, en México (COMECARNE, 2017).

La mayoría de estos productos cárnicos son rebanados y preempacados al vacío o bajo atmósferas modificadas, y se venden con fechas de caducidad de 3-4 o hasta 6 semanas. Durante su elaboración, los productos cárnicos son calentados a 65-75°C con lo cual muere la mayoría de las células vegetativas. Por lo tanto la manipulación y el rebanado recontaminan el producto con 0.5 – 2 log UFC/g de cuenta bacteriana total (CBT), principalmente bacterias ácido lácticas. Cuando se almacenan bajo condiciones anaeróbicas y en refrigeración, las LAB psicrótrofas son responsables del deterioro de productos cárnicos, debido a su tolerancia a ambientes micro-aerófilos o anaeróbicos (Vermeiren *et al.*, 2005).

Se decidió estimar la población de BAL y BT debido a su asociación con el deterioro. La actividad metabólica de BAL provoca características de deterioro como presencia de amargor, exudados, producción de limo, hinchazón del paquete a través de la producción de CO₂ y aparición de coloración verdosa (Beuchat *et al.*, 2001). *Brochothrix thermosphacta* también puede formar parte dominante de la flora de deterioro dependiendo de la permeabilidad de película y el oxígeno residual después del empaquetado al vacío. El patrón de deterioro de *B. thermosphacta* asociado con el metabolismo anaerobio es más lento que el asociado con crecimiento aeróbico (Pin *et al.*, 2002).

En el Cuadro 9, se observa que, al inicio del experimento (día 0), se logró recuperar una población de 10^5 UFC/g de las muestras de jamón inoculadas con *Brochothrix thermosphacta* (BT). En cuanto a la población de bacterias ácido lácticas (BAL), las muestras de jamón presentaron una carga de $1.3 - 1.5 \times 10^2$ UFC/g, la cual se encuentra dentro de los límites normales. En el caso de la cuenta bacteriana total (CBT), el conteo fue de 10^7 UFC/g; considerando el inóculo de *B. thermosphacta* más las BAL, está dentro de lo esperado. Al día 0 no se observaron diferencias significativas para los parámetros microbiológicos ni fisicoquímicos entre los tratamientos.

Para el segundo muestreo (día 7), la población de BT aumentó aproximadamente 1 log, obteniendo 6.56 ± 0.05 log UFC/g en la muestra control positivo. Por otro lado, la población de BAL aumentó alrededor de 4 log, obteniendo 7.53 ± 0.01 log UFC/g en la muestra control positivo. BT es más sensible a la presencia de nitrito residual que las BAL, por lo anterior, la tasa de crecimiento de BT es más lenta que la de BAL (Gardner *et al.*, 1981). Además, *Brochothrix thermosphacta* no es competitivo en condiciones anaeróbicas y es rápidamente superado por lactobacilos (especialmente *Lb. sakei* y *Lb. curvatus*) en productos cárnicos refrigerados envasados al vacío (Stiles y Holzapfel, 1997). Al comparar el control (J) con la muestra tratada con recubrimiento activo (JRN), se observó una disminución de BT de 0.5 log de UFC/g. Dicha diferencia es atribuida a la presencia de nisina, ya que en el caso de la muestra tratada con el recubrimiento sin nisina (JR), no hubo diferencias significativas con el control (J). En el caso de BAL, la disminución fue de 0.3 log de UFC/g en la muestra JRN, respecto al control positivo. Estas ligeras diferencias no se reflejaron en la cuenta bacteriana total (CBT). También se observó una disminución en el pH debido a la producción de ácido láctico por BAL, las cuales fermentan los carbohidratos presentes y producen ácido láctico como metabolito (Kalschne *et al.*, 2014).

Para el tercer muestreo (día 14) las diferencias no son significativas entre el control y las muestras tratadas en el conteo de BT y BAL. Sí hay una diferencia significativa en la CBT, lo que significa que el tratamiento de recubrimiento activo

tuvo un efecto sobre algún microorganismo que no se monitoreó en este experimento.

Para los siguientes muestreos (día 21 y día 28) sí hubo una diferencia significativa entre el control positivo y las muestras tratadas con el recubrimiento activo, en la población de BT. Se observaron reducciones de 0.42 y 0.54 log, respectivamente. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en los parámetros de BAL y CBT.

Cuadro 9. Propiedades microbiológicas y fisicoquímicas de las muestras de jamón

| Días | Tratamiento | Propiedades microbiológicas | | | Fisicoquímicas |
|------|-------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------------------|
| | | <i>Brochothrix thermosphacta</i> | BAL | CBT | pH |
| 0 | J | 5.89 ± 0.20 ^{d,e,f} | 3.16 ± 0.02 ^f | 7.24 ± 0.03 ^c | 6.28 ± 0.01 ^a |
| | JR | 5.83 ± 0.13 ^{e,f} | 3.18 ± 0.06 ^f | 7.23 ± 0.06 ^c | 6.26 ± 0.01 ^a |
| | JRN | 5.86 ± 0.06 ^{d,e,f} | 3.13 ± 0.03 ^f | 7.14 ± 0.12 ^c | 6.27 ± 0.02 ^a |
| 7 | J | 6.56 ± 0.05 ^{a,b} | 7.53 ± 0.01 ^d | 8.45 ± 0.17 ^b | 4.98 ± 0.04 ^{b,c,d} |
| | JR | 6.49 ± 0.03 ^b | 7.52 ± 0.03 ^d | 8.45 ± 0.17 ^b | 5.02 ± 0.01 ^{c,d} |
| | JRN | 6.05 ± 0.03 ^c | 7.24 ± 0.09 ^e | 8.42 ± 0.12 ^b | 5.04 ± 0.03 ^{d,e} |
| 14 | J | 6.82 ± 0.04 ^a | 8.62 ± 0.07 ^a | 9.54 ± 0.16 ^a | 4.91 ± 0.03 ^{g,h} |
| | JR | 6.83 ± 0.04 ^a | 8.72 ± 0.24 ^a | 9.36 ± 0.05 ^a | 4.91 ± 0.04 ^{g,h} |
| | JRN | 6.69 ± 0.06 ^{a,b} | 8.75 ± 0.16 ^a | 8.68 ± 0.38 ^b | 4.93 ± 0.02 ^{f,g,h} |
| 21 | J | 6.10 ± 0.04 ^{c,d} | 8.16 ± 0.02 ^b | 9.28 ± 0.02 ^a | 5.08 ± 0.03 ^{b,c} |
| | JR | 6.04 ± 0.06 ^{c,d,e} | 8.19 ± 0.04 ^b | 9.30 ± 0.02 ^a | 5.11 ± 0.02 ^b |
| | JRN | 5.68 ± 0.07 ^{f,g} | 8.17 ± 0.07 ^b | 9.28 ± 0.02 ^a | 5.08 ± 0.03 ^{b,c,d} |
| 28 | J | 6.02 ± 0.08 ^{c,d,e} | 8.13 ± 0.03 ^b | 9.35 ± 0.07 ^a | 5.06 ± 0.02 ^{b,c,d,e} |
| | JR | 6.02 ± 0.13 ^{c,d,e} | 8.12 ± 0.03 ^b | 9.34 ± 0.04 ^a | 5.04 ± 0.02 ^{b,c,d,e} |
| | JRN | 5.48 ± 0.06 ^g | 8.11 ± 0.02 ^{b,c} | 9.34 ± 0.02 ^a | 5.06 ± 0.04 ^{b,c,d,e} |

J=jamón inoculado con *Brochothrix thermosphacta* (BT), se utilizó como control.

JR= jamón inoculado con BT, y con recubrimiento de proteína de chícharo y quitosano (PC:QT);
JRN = jamón inoculado con BT y con recubrimiento activo (PC:QT + Nisina)

*Los resultados se reportan como la media ± la desviación estándar.

*Letras iguales indican que no existe diferencia significativa (p<0.05)

También se incluyó el monitoreo del jamón sin inocular, para evaluar el comportamiento del jamón en ausencia del inóculo. La población de BT se mantuvo debajo del límite de cuantificación $<1 \log \text{ UFC/g}$ durante los 28 d. La población de BAL y CBT resulto significativamente diferente del día 0 al 21. Es decir, del día 21 al 28, se comportó de manera similar que la de los otros tratamientos inoculados con BT. En la Figura 10 se muestran los resultados separados por microorganismo.

En general, la aplicación del recubrimiento activo (JRN) al jamón inoculado con *B. thermosphacta*, no tuvo el efecto deseado. Es decir, las reducciones en las poblaciones de BT, BAL y CBT mostradas en este estudio no representan un beneficio práctico para una aplicación a nivel comercial. Lo anterior posiblemente se debió a que la concentración de nisina no fue suficiente para controlar el crecimiento del microorganismo inoculado; en dado caso se recomienda incrementar la concentración de nisina adicionada al jamón; de acuerdo al FSIS se permite adicionar hasta 220 ppm en productos cárnicos (FSIS, 2017).

Otra posible causa es que la difusión de la nisina no se llevó a cabo en las mejores condiciones, ya que el pH de la solución filmogénica afecta el coeficiente de difusión de la nisina. Dicho coeficiente se ve favorecido a pH menores. Rossi-Márquez *et al.* (2009), reportaron que a pH 7, solo se liberó un bajo porcentaje de nisina, debido a que el antimicrobiano está por debajo de su punto isoeléctrico ($pI \sim 10$) produciendo una carga positiva, la cual puede interactuar con las cargas negativas de las proteínas de suero utilizadas para esas películas. Mientras que a pH de 4, la nisina muestra una repulsión electrostática con las proteínas de la película, debido a que ambas moléculas tienen una carga neta positiva, lo cual favorece la liberación de nisina hacia soluciones acuosas.

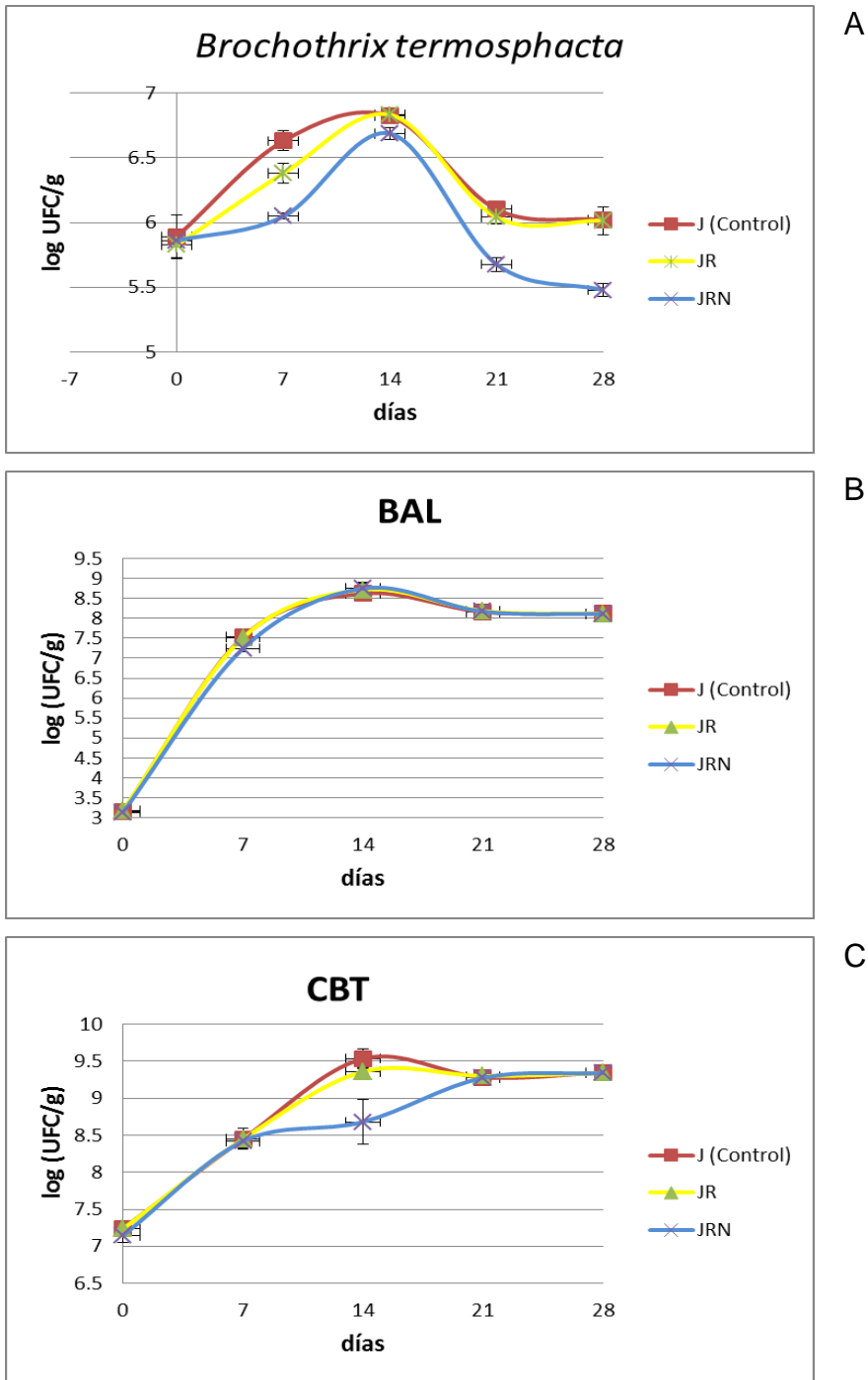


Figura 10. Monitoreo de A) *Brochothrix thermosphacta*; B) bacterias ácido lácticas C) cuenta bacteriana total en rebanadas de jamón

J=jamón inoculado con *Brochothrix thermosphacta* (BT), se utilizó como control.
 JR= jamón inoculado con BT, y con recubrimiento de proteína de chícharo y quitosano (PC:QT); JRN = jamón inoculado con BT y con recubrimiento activo (PC:QT + Nisina)

Adicionalmente, es posible que las bacterias hayan desarrollado una resistencia a la nisina, debido a la presencia de nisina en exceso, es decir, debido a que la nisina se difundió rápidamente. De acuerdo a Chi-Zhang y Chikindas, (2004) *Listeria monocytogenes* desarrolló una resistencia instantánea a la bacteriocina cuando ésta se difundió rápidamente, mientras que cuando la nisina se difundió lentamente, solo se observó una tolerancia temporal, y las células de *L. monocytogenes* volvieron a ser sensibles a la nisina. Para el presente proyecto una difusión más lenta podría lograrse al incluir TG en la formulación de la suspensión filmogénica, como se demostró en la Figura 9. Además, si se aplica en forma de película (matriz sólida) la liberación de nisina podría ser aún más controlada, obteniendo mejores resultados.

Se recomienda incluir un control de nisina (sin los otros componentes del recubrimiento) para demostrar si hay ventajas en utilizar una solución filmante como acarreadora de nisina, y que además controle su difusión. Cuando la nisina se agrega directamente a los alimentos, se han reportado problemas como pérdida de actividad, distribución heterogénea en la matriz alimentaria, inactivación por enzimas proteolíticas, y surgimiento de resistencia en bacterias que normalmente son sensibles a la nisina. Para superar estos problemas, la nisina puede ser inmovilizada en matrices sólidas (recubrimientos) que actúan como barreras de difusión y que permiten controlar la velocidad de difusión (Gharsallaoui y Degraeve, 2016).

También sería interesante evaluar si el recubrimiento activo (JRN) tiene un efecto en una muestra sin inocular. Es decir, si hay una reducción en la población de BAL y CBT. Kalschne *et al.* (2014) demostraron la reducción de 2 log de BAL en jamón cocido, al adicionar nisina, sin embargo, ésta fue añadida como aditivo durante la elaboración del jamón y en una cantidad superior a la que permite la legislación mexicana.

Otra recomendación es probar el efecto de la nisina Z, ya que ésta es más soluble que la nisina A cuando se trabaja a pH mayores a 6 debido a que la asparagina de la nisina Z es más polar que la histidina (De Vos *et al.*, 1993). Pero

debería notarse que se tendría una mayor cantidad de cargas positivas que tendrían una repulsión con la proteína (PC) produciendo una película poco homogénea.

6.8 Biodegradabilidad

La biodegradabilidad es una propiedad añadida de ciertos tipos de materiales, ya que se refiere a una re-integración de los materiales utilizados al medio ambiente, evitando así la contaminación. Durante el proceso de biodegradabilidad, los microorganismos naturalmente presentes convierten o “rompen” el polímero en agua, dióxido de carbono y biomasa (Benyathiar *et al.*, 2016). La propiedad de biodegradación depende de su estructura química (composición, cristalinidad), y no de la fuente del polímero, siempre y cuando los microorganismos responsables de la biodegradación posean enzimas capaces de degradarlos. Esto significa que no todos los bioplásticos (ó biopolímeros) son biodegradables (Kyrikou y Briassoulis, 2007).

Para este proyecto se evaluó la biodegradabilidad de dos películas a base de bio-polímeros (T6 y T8).

En el caso del tratamiento T6 (PC:QT + N), al día 7 se observó un ligero crecimiento de esporas rugosas de color negro características de *Aspergillus niger*, sobre la película. En comparación con el control T6 (película sin suspensión de esporas), donde sólo se observó cambio de color en el medio y ligero crecimiento blanco con apariencia algodonosa. Para el día 14 se presentó en el tratamiento T6 un crecimiento mediano de los hongos, otorgándose una calificación de 3. Dicho porcentaje de crecimiento se mantuvo a los 21 d, mientras que para los 28 d, aumentó el crecimiento sobre la película y en el medio de cultivo, por lo cual se otorgó una calificación de 4 (Cuadro 10, primera y segunda columna).

Se observaron resultados similares para el tratamiento T8 (PC:QT + N + TG). Durante la prueba, el control T8 (película sin suspensión de esporas) sufrió cambios en la coloración del medio debido al crecimiento de algunos hongos, sin embargo al final se mantuvo la forma circular del trozo de película. La película T8

también inició con un ligero crecimiento desde el día 7, y finalizó con un abundante crecimiento en la superficie de la película. A pesar que no hay tanto crecimiento de cepas de *Aspergillus niger* en comparación con el tratamiento T6, sí se logró una desintegración total de la película T8 al finalizar la prueba. Lo anterior indica que la presencia de transglutaminasa en la película T8 no afecta la biodegradabilidad (Cuadro 10, tercera y cuarta columna).

Como prueba adicional, se intentaron retirar los trozos de película para evaluar la integridad de ésta. En el caso del papel filtro, después de 28 d aún se mantiene la forma circular del trozo de la película, (Figura 11 A). En el caso de la película de PC:QT y N, no fue posible retirar los tozos ya que estaban totalmente fragmentados y adheridos al medio de cultivo (Figura 11 B).

Los materiales que son capaces de descomponerse en dióxido de carbono, agua y biomasa a una velocidad comparable con un material compostable (por ejemplo la celulosa) , sin dejar residuos tóxicos, son llamados “plásticos compostables” (ISWA, 2015). Por lo tanto, debido que la película de PC:QT + N se biodegrada más rápidamente que el papel filtro compuesto de celulosa, se puede concluir que la película de PC:QT + N es compostable.

Cabe destacar que debido a la naturaleza de las películas de PC:QT y N, no fue posible evaluar las propiedades después de la biodegradabilidad, ya que al cabo de 28 días en contacto con los microorganismos, las películas estaban completamente fragmentadas.

Cuadro 10. Biodegradabilidad de películas de proteína de chícharo:quitosano y nisina en ausencia de TG (T6) y presencia de TG (T8).

| días | Control T6 | T6 (PC:QT + N) | Control T8 | T8 (PC:QT + N+ TG) |
|------|------------|-------------------|------------|-----------------------|
| 7 | 0* | 1 | 0 | 1 |
| 14 | 0 | 3 | 0 | 2 |
| 21 | 1 | 3 | 1 | 3 |
| 28 | 1 | 4 | 1 | 4 |

*Los números arriba de cada imagen corresponden a la escala de crecimiento descrita en el cuadro 3. 0=ninguno; 1= trazas de crecimiento; 2=crecimiento ligero; 3= crecimiento medio; 4= crecimiento fuerte.

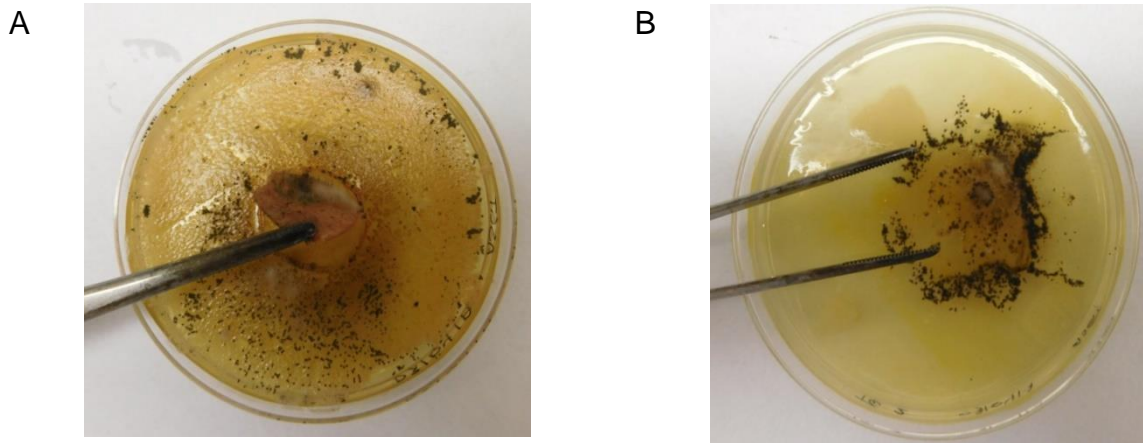


Figura 11. Remoción de los trozos de papel filtro (A) y película de proteína de chícharo:quitosano y nisina (B) al finalizar la prueba de biodegradabilidad

Algunos autores sí han logrado evaluar las propiedades después de la prueba de biodegradabilidad, ya que los materiales probados son más resistentes. Por ejemplo, Shang *et al.* (2009), evaluaron la biodegradabilidad de elastómeros de polietileno octeno (POE) en mezcla con diferentes porcentajes de almidón. Después de 28 d de cultivo encontraron un abundante crecimiento fúngico (calificación 4) en la superficie de las mezclas de POE/almidón. Evaluaron la pérdida de peso, la morfología por MEB y determinaron las propiedades mecánicas. La pérdida de peso de las películas aumentó al incrementar el porcentaje de almidón. Por otro lado después de la biodegradación, las imágenes de MEB de la superficie de las películas de POE/ almidón mostraron grietas y agujeros debido a la acción de los microorganismos. La fuerza de tensión en las películas de POE/almidón disminuyó debido al ataque microbiológico, y por el contrario la elongación aumentó después de la biodegradabilidad.

6.9 Digestibilidad *in vitro*

La digestión gástrica se llevó a cabo en condiciones fisiológicas, con la finalidad de evaluar la posible digestión de las películas en el estómago. La proteína de chícharo está compuesta por legumina (~320-380 kDa), vicilina (~170 kDa) y convicilina (~290 kDa), y a su vez se componen de subunidades de menor peso molecular (Barac *et al.*, 2010).

Durante la electroforesis posiblemente alguna de estas subunidades no se hidrolizó y otra se hidrolizó parcialmente. Se observó que alguna unidad de la proteína de chícharo (contenida en la película comestible) no se digirió completamente en el ambiente gástrico incluso después de 60 min de incubación con pepsina (proteólisis), ya que no se observan bandas menores a ~70 kDa. Posiblemente dicha banda corresponde a la subunidad de convicilina con un peso molecular de 71 kDa (Figura 12).

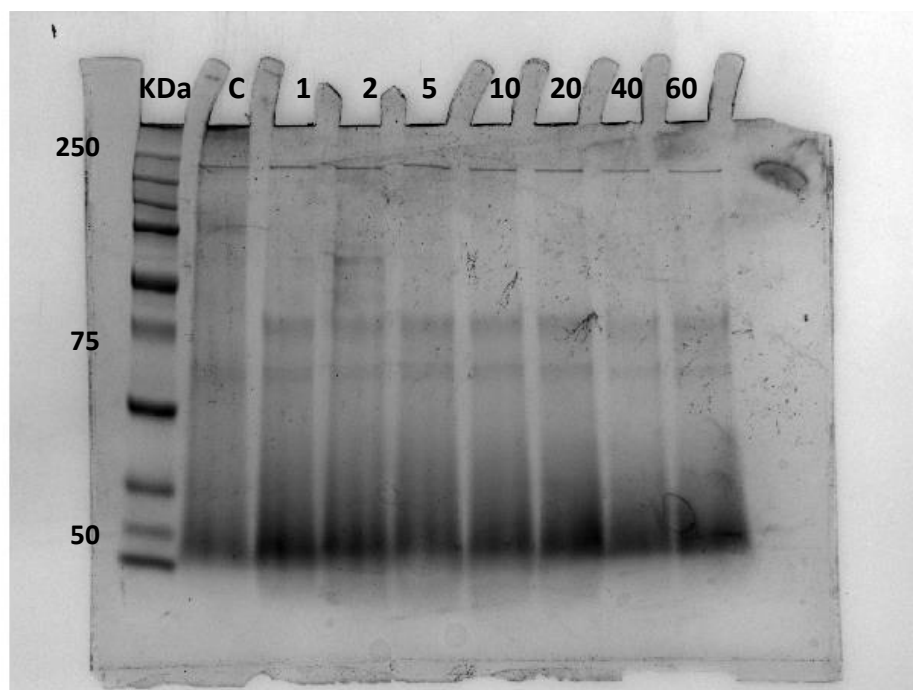


Figura 12. Digestión gástrica en el tiempo (min), de película de proteína de chícharo, quitosano y nisina, bajo condiciones fisiológicas.

C: muestra control incubada por 60 min sin proteasa.

Giosafatto *et al.* (2014) evaluaron la digestibilidad gástrica y duodenal de películas de pectina:faseolina en presencia y ausencia de transglutaminasa, concluyendo que la TG mejora la proteólisis de la faseolina. El incremento en la susceptibilidad de las macromoléculas entrecruzadas con TG, posiblemente se debe a que la modificación enzimática cambia la estructura tridimensional de las proteínas, exponiendo algunos residuos de aminoácidos que son sensibles a la digestión gástrica o duodenal.

Se recomienda realizar un tratamiento adicional de las muestras de la digestibilidad gástrica, para simular la digestibilidad duodenal con tripsina y quimotripsina y evaluar si en esta fase se completa la digestibilidad de las películas comestibles. Además se recomienda evaluar la digestibilidad de las películas de PC:QT + N en presencia de TG.

7. CONCLUSIONES

La determinación del potencial ζ , el tamaño de partícula y el índice de polidispersión mostraron ser de gran utilidad para predecir la estabilidad de las suspensiones filmogénicas.

Las suspensiones filmogénicas elaboradas con proteína de chícharo, quitosano, nisina y transglutaminasa mostraron ángulos de contacto menores a 90° y por lo tanto son de carácter hidrofílico.

El quitosano y la transglutaminasa mejoraron las propiedades mecánicas de las películas. La fuerza de tensión y el porcentaje de elongación aumentaron, mientras el módulo de Young disminuyó.

Las películas que contenían TG presentaron una superficie más suave, continua y homogénea. Debido a esto, también mejoraron las propiedades de barrera al CO₂ y O₂ de las películas con TG.

Los espectros Raman de las películas que contenían TG mostraron interacciones entre los residuos de Lis y Gln correspondientes a la proteína de chícharo o la nisina.

Las propiedades antimicrobianas de las SF (líquido) se mantuvieron en presencia de TG. Sin embargo en los recubrimientos (sólido) hubo una reducción ~19% de la actividad antimicrobiana en presencia de transglutaminasa.

Se lograron reducciones de 0.5 log en rebanadas de jamón inoculado con *Brochothrix thermosphacta* y tratados con recubrimiento activo de nisina. Dicha reducción no es práctica para una aplicación comercial.

Se comprobó la biodegradabilidad de las películas ya que éstas se desintegraron incluso más rápido que el papel filtro (celulosa).

8. REFERENCIAS

- Anónimo (2004). Zetasizer nano series user manual. *MAN0317*, (1.1)
- Arredondo-Ochoa, T. (2013). Diseño de empaques comestibles activos a base de almidón modificado para su posible aplicación en alimentos en fresco. Tesis para obtener grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.
- ASTM G21-96 (2002) "Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi
- ASTM, D3985-81 (1981). Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, 534.
- ASTM, D882-97 (1997). Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, 159.
- ASTM, E96-93 (1993). Annual book of ASTM standards. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials, 701.
- Barac, M., Cabrilo, S., Pesic, M., Stanojevic, S., Zilic, S., Macej, O., y Ristic, N. (2010). Profile and functional properties of seed proteins from six pea (*Pisum sativum*) genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 4973-4990
- Bautista-Baños, S., Hernandez-Lauzardo, A. N., Velazquez-Del Valle, M. G., Hernández-López, M., Barka, E. A., Bosquez-Molina, E., y Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25(2), 108-118.
- Bégin, A., y Van Calsteren, M. R. (1999). Antimicrobial films produced from chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26(1), 63-67.
- Benyathiar, P., Selke, S., y Auras, R. (2016). The Effect of Gamma and Electron Beam Irradiation on the Biodegradability of PLA Films. *Journal of Polymers and the Environment*, 24(3), 230-240.

- Beuchat, L. R., Doyle, M. P., y Thomas, J. (2001). *Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras/Food microbiology and frontiers* (No. 579.57). Acribia.
- Bourtoom, T. (2009). Edible protein films: properties enhancement. *International Food Research Journal*, 16(1):1-9.
- Breukink, E., y de Kruijff, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nature reviews. Drug discovery*, 5(4), 321.
- British Standards Institute (1974). Methods for the estimation and differentiation of nisin in processed cheese. British Standards Institution Bulletin, 4020, London
- Campos, C. A., Gerschenson, L. N., y Flores, S. K. (2011). Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849-875.
- Cao-Hoang, L., Chaine, A., Grégoire, L., y Waché, Y. (2010). Potential of nisin incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food microbiology*, 27(7), 940-944
- Carraher, C.E. (2007). *Seymour/Carraher's Polymer Chemistry*, 7th Ed., CRC Press, Boca Raton, FL.
- Cé, N., Noreña, C. P., y Brandelli, A. (2012). Antimicrobial activity of chitosan films containing nisin, peptide P34, and natamycin. *CyTA-Journal of Food*, 10(1), 21-26.
- Chi-Zhang, Y., Yam, K. L., y Chikindas, M. L. (2004). Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. *International Journal of Food Microbiology*, 90(1), 15-22.
- Chourpa, I., Ducel, V., Richard, J., Dubois, P., & Boury, F. (2006). Conformational modifications of α gliadin and globulin proteins upon complex coacervates formation with gum arabic as studied by raman microspectroscopy. *Biomacromolecules*, 7(9), 2616-2623.

- Chung, Y. C., Su, Y. P., Chen, C. C., Jia, G., Wang, H. L., Wu, J. G., y Lin, J. G. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(7), 932-936.
- Colla, E., Sobral, P. J. A., y Menegalli, F. C. (2006). Effect of composite edible coating from *Amaranthus cruentus* flour and stearic acid on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Latin American Applied Research*, 36(4), 249-254.
- COMECARNE. Consejo Mexicano de la Carne con datos del SIAP e INEGI. Fecha de consulta: 21 de agosto de 2017. <https://comecarne.org/wp-content/uploads/2012/07/CMC-Industria-C%C3%A1rnica-en-Cifras.pdf>
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A., y Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. *Critical Reviews in Food Science*, 38(4), 299-313.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., y Debevere, J. (2004). New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14(4), 273-285.
- Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A. E., Masi, P., y Porta, R. (2006). Chitosan- whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: analysis of their mechanical and barrier properties. *Biomacromolecules*, 7(3), 744-749.
- Di Pierro, P., Rossi Marquez, G., Mariniello, L., Sorrentino, A., Villalonga, R., y Porta, R. (2013). Effect of transglutaminase on the mechanical and barrier properties of whey protein/pectin films prepared at complexation pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(19), 4593-4598.
- Escamilla-García, M., Calderon-Dominguez, G., Chanona-Perez, J. J., Farrera-Rebollo, R. R., Andraca-Adame, J. A., Arzate-Vazquez y Moreno-Ruiz, L. A. (2013). Physical and structural characterisation of zein and chitosan edible films using nanotechnology tools. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 196-203

FAOSTAT, Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database.
Fecha de consulta: 22 de abril de 2016.
<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>

FSIS Directive. Food Safety and Inspection Services 7120.1 Rev. 42. FDA. Fecha de consulta: 4 de septiembre de 2017.
<https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/regulations/directives>

Gardner, G.A. (1981) *Brochothrix thermosphacta* (*Microbacterium thermosphactum*) in the spoilage of meats: a review in Psychrotrophic Micro-organisms in Spoilage and Pathogenicity. Ed. Roberts, T.A., Hobbs, G., Christian, J.H.B. and Skovgaard, N. pp. 140–173. London: Academic Press.

Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., y Degraeve, P. (2016). Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1262-1274.

Giosafatto, C. V. L., Di Pierro, P., Gunning, P., Mackie, A., Porta, R., Mariniello, L. 2014. Characterization of citrus pectin edible films containing transglutaminase-modified phaseolin. *Carbohydrate Polymers*, 106, 200-208.

González-Toledo, S. Y., Domínguez-Domínguez, J., García-Almendárez, B. E., Prado-Barragán, L. A., y Regalado-González, C. (2010). Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented whey as alternative culture medium. *Journal of Food Science*, 75(6).

Han, J. H., y Aristippos, G. , “Edible films and coatings: a review,” in *Innovations in Food Packaging*, J. H. Han, Ed., pp. 239–262, Elsevier Science, New York, NY, USA, 2005.

Hanifi, S., Oromiehie, A., Ahmadi, S., y Farhadnejad, H. (2014). (Corn Starch and Montmorillonite Nanocomposite)-Reinforced Polypropylene: Preparation, Properties, and Biodegradability. *Journal of Vinyl and Additive Technology*, 20(1), 16-23.

- Hernández-Hernández, E., Lira-Moreno, C. Y., Guerrero-Legarreta, I., Wild-Padua, G., Di Pierro, P., García-Almendárez, B. E., y Regalado-González, C. (2017). Effect of Nanoemulsified and Microencapsulated Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth) Essential Oil Coatings on Quality of Fresh Pork Meat. *Journal of Food Science*, 82(6), 1423-1432.
- Hernández-Hernández, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M. E., y Legarreta, I. G. (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*, 81(2), 410-417.
- Hernandez-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velazquez-Del Valle, M. G., Méndez-Montealvo, M. G., Sánchez-Rivera, M. M., y Bello-Perez, L. A. (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*, 73(4), 541-547.
- Herrero, A. M., Carmona, P., Pintado, T., Jiménez-Colmenero, F., y Ruíz-Capillas, C. (2011). Olive oil-in-water emulsions stabilized with caseinate: Elucidation of protein-lipid interactions by infrared spectroscopy. *Food Hydrocolloids*, 25(1), 12-18.
- Irkin, R., y Esmer, O. K. (2015). Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6095-6111.
- ISWA. International Solid Waste Association (2015). An Overview of the Compostability of Biodegradable Plastics and its Implications for the Collection and Treatment of Organic Wastes.
- Janjarasskul, T., y Krochta, J. M. (2010). Edible packaging materials. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 415-448.
- Jiang, S. J., Zhang, X., Ma, Y., Tuo, Y., Qian, F., Fu, W., y Mu, G. (2016). Characterization of whey protein-carboxymethylated chitosan composite

- films with and without transglutaminase treatment. *Carbohydrate Polymers*, 153, 153-159.
- Jofre, A., Aymerich, T., y Garriga, M. (2008). Assessment of the effectiveness of antimicrobial packaging combined with high pressure to control *Salmonella* sp. in cooked ham. *Food Control*, 19(6), 634-638.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., y Tanaka, M. (2006). Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper. *European Food Research and Technology*, 222(3-4), 229-235.
- Kalschne, D. L., Geitenes, S., Veit, M. R., Sarmiento, C. M., y Colla, E. (2014). Growth inhibition of lactic acid bacteria in ham by nisin: a model approach. *Meat Science*, 98(4), 744-752.
- Kang, Z. L., Li, X., y Ma, H. J. (2017). Effect of the levels of transglutaminase in frankfurters: a physical–chemical and Raman spectroscopy study. *CyTA-Journal of Food*, 15(1), 75-80
- Kieliszek, M., y Misiewicz, A. (2014). Microbial transglutaminase and its application in the food industry. A review. *Folia Microbiologica*, 59(3), 241-250.
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., y Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51-63.
- Kowalczyk, D., Gustaw, W., Świeca, M., y Baraniak, B. (2014). A study on the mechanical properties of pea protein isolate films. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(4), 1726-1736.
- Kyrikou, I., y Briassoulis, D. (2007). Biodegradation of agricultural plastic films: a critical review. *Journal of Polymers and the Environment*, 15(2), 125-150.
- Lacroix, M. (2009). Mechanical and permeability properties of edible films and coatings for food and pharmaceutical applications. In *Edible films and coatings for food applications* (pp. 347-366). Springer New York.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Liu, W., y Hansen, J. N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2551-2558.
- Malhotra, B., Keshwani, A., y Kharkwal, H. (2015). Antimicrobial food packaging: potential and pitfalls. *Frontiers in Microbiology*, 6.
- Marinangeli, C. P., Kassis, A. N., y Jones, P. J. (2009). Glycemic responses and sensory characteristics of whole yellow pea flour added to novel functional foods. *Journal of Food Science*, 74(9), S385-S389.
- Mariniello, L., Porta, R., Sorrentino, A., Giosafatto, C. V. L., Marquez, G. R., Esposito, M., y Di Pierro, P. (2014). Transglutaminase-mediated macromolecular assembly: production of conjugates for food and pharmaceutical applications. *Amino acids*, 46(3), 767-776.
- McClements, D. J. (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter*, 7(6), 2297-2316.
- No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., y Meyers, S. P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1), 65-72.
- Ochoa, T. A., Almendárez, B. E. G., Reyes, A. A., Pastrana, D. M. R., López, G. F. G., Belloso, O. M., y Regalado-González, C. (2017). Design and Characterization of Corn Starch Edible Films Including Beeswax and Natural Antimicrobials. *Food and Bioprocess Technology*, 10(1), 103-114.
- Osés, J., Fernández-Pan, I., Mendoza, M., y Maté, J. I. (2009). Stability of the mechanical properties of edible films based on whey protein isolate during storage at different relative humidity. *Food Hydrocolloids*, 23(1), 125-131.
- Otoni, C. G., Avena-Bustillos, R. J., Azeredo, H., Lorevice, M. V., Moura, M. R., Mattoso, L. H., y McHugh, T. H. (2017). Recent Advances on Edible Films

Based on Fruits and Vegetables—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1151-1169.

Overman, S. A., y Thomas, G. J. (1999). Raman markers of nonaromatic side chains in an α -helix assembly: Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Ser, and Val residues of phage fd subunits. *Biochemistry*, 38(13), 4018-4027.

Park, S. I., Daeschel, M. A., y Zhao, Y. (2004). Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. *Journal of Food Science*, 69(8), M215-M221.

Pavlath A.E. y Orts W. (2009) Edible films and Coatings: Why, What and How? En: Milda E. Embuscado y Kerry C. Huber (Ed.). Edible films and coatings for food applications. Springer, New York. p. 1-22

Pérez, V., Felix, M., Romero, A., y Guerrero, A. (2016). Characterization of pea protein-based bioplastics processed by injection moulding. *Food and Bioproducts Processing*, 97, 100-108.

Pérez-Gallardo, A., Bello-Pérez, L. A., García-Almendárez, B., Montejano-Gaitán, G., Barbosa-Cánovas, G., y Regalado, C. (2012). Effect of structural characteristics of modified waxy corn starches on rheological properties, film-forming solutions, and on water vapor permeability, solubility, and opacity of films. *Starch-Stärke*, 64(1), 27-36.

Perisic, N., Afseth, N. K., Ofstad, R., Hassani, S., y Kohler, A. (2013). Characterising protein, salt and water interactions with combined vibrational spectroscopic techniques. *Food Chemistry*, 138(1), 679-686.

Pin, C., de Fernando, G. D. G., y Ordóñez, J. A. (2002). Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4441-4447.

Piper, C., Hill, C., Cotter, P. D., y Ross, R. P. (2011). Bioengineering of a Nisin A-producing *Lactococcus lactis* to create isogenic strains producing the natural variants Nisin F, Q and Z. *Microbial Biotechnology*, 4(3), 375-382.

- Pires, C., Ramos, C., Teixeira, B., Batista, I., Nunes, M. L., y Marques, A. (2013). Hake proteins edible films incorporated with essential oils: physical, mechanical, antioxidant and antibacterial properties. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 224-231.
- Porta, R., Di Pierro, P., Rossi-Marquez, G., Mariniello, L., Kadivar, M., y Arabestani, A. (2015). Microstructure and properties of bitter vetch (*Vicia ervilia*) protein films reinforced by microbial transglutaminase. *Food Hydrocolloids*, 50, 102-107.
- Porta, R., Di Pierro, P., Sabbah, M., Regalado-Gonzales, C., Mariniello, L., Kadivar, M., y Arabestani, A. (2016). Blend films of pectin and bitter vetch (*Vicia ervilia*) proteins: Properties and effect of transglutaminase. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 36, 245-251.
- Prombutara, P., Kulwatthanasal, Y., Supaka, N., Sramala, I., y Chareonpornwattana, S. (2012). Production of nisin-loaded solid lipid nanoparticles for sustained antimicrobial activity. *Food Control*, 24(1), 184-190.
- Quirós-Sauceda, A. E., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I., y González-Aguilar, G. A. (2014). Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 1674-1685.
- Ravishankar, S., Jaroni, D., Zhu, L., Olsen, C., McHugh, T., y Friedman, M. (2012). Inactivation of *Listeria monocytogenes* on Ham and Bologna Using Pectin-Based Apple, Carrot, and *Hibiscus* Edible Films Containing Carvacrol and Cinnamaldehyde. *Journal of Food Science*, 77(7).
- Resa, C. P. O., Jagus, R. J., y Gerschenson, L. N. (2014). Effect of natamycin, nisin and glycerol on the physicochemical properties, roughness and hydrophobicity of tapioca starch edible films. *Materials Science and Engineering: C*, 40, 281-287.
- Reyes-González, L.R. (2013). Caracterización de dispersiones filmogénicas a base de almidón de maíz y ácido oleico en nanoemulsión con capacidad de

formación de recubrimientos comestibles activos. Tesis para obtener grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

Romano, A., Giosafatto, C. V. L., Di Pierro, P., Romano, R., Masi, P., y Mariniello, L. (2016). Impact of transglutaminase treatment on properties and in vitro digestibility of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flour. *Food Research International*, 88, 239-246.

Rossi-Márquez, G. (2007). Efecto del pH y temperatura en la liberación de nisina de una película comestible a base de proteína de suero de diferentes espesores. Tesis para obtener grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro.

Rossi-Márquez, G. (2011). Development of enzymatically reticulated edible films to be used as active packaging. Tesis Doctoral. Universidad de Nápoles, Italia.

Rossi-Márquez, G., Han, J. H., García-Almendárez, B., Castaño-Tostado, E., & Regalado-González, C. (2009). Effect of temperature, pH and film thickness on nisin release from antimicrobial whey protein isolate edible films. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(14), 2492-2497.

Russell, N. J., y Gould, G. W. (Eds.). (2003). Food preservatives. Springer Science y Business Media.

Sabbah, M., Esposito, M., Pierro, P. D., Giosafatto, C. V. L., y Mariniello, L. (2016). Insight into Zeta Potential Measurements in Biopolymer Film Preparation. *Journal of Biotechnology Biomaterials*, 6, 126.

SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. SIAP Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Fecha de consulta: 22 de abril de 2017 <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>

Salopek, B., Krasic, D., y Filipovic, S. (1992). Measurement and application of zeta-potential. *Rudarsko-geolosko-naftni zbornik*, 4(1), 147.

- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B. E., Santos-López, E. M., Reyes-González, L. R., y Regalado, C. (2016). Characterization and antimicrobial effect of starch-based edible coating suspensions. *Food Hydrocolloids*, 52, 906-913.
- Sánchez-Ortega, I., García-Almendárez, B. E., Santos-López, E. M., Amaro-Reyes, A., Barboza-Corona, J. E., y Regalado, C. (2014). Antimicrobial edible films and coatings for meat and meat products preservation. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Santiago-Silva, P., Soares, N. F., Nóbrega, J. E., Júnior, M. A., Barbosa, K. B., Volp, A. C. P. y Würlitzer, N. J. (2009). Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, 20(1), 85-89.
- Sebti, I., Delves-Broughton, J., y Coma, V. (2003). Physicochemical properties and bioactivity of nisin-containing cross-linked hydroxypropylmethylcellulose films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6468-6474.
- Shang, X. Y., Fu, X., Chen, X. D., y Yang, L. S. (2009). Biodegradation of blends of polyethylene-octene elastomer with starches by fungi. *Journal of Applied Polymer Science*, 114(6), 3574-3584.
- Sindelar, J. J., Cordray, J. C., Sebranek, J. G., Love, J. A., y Ahn, D. U. (2007). Effects of Varying Levels of Vegetable Juice Powder and Incubation Time on Color, Residual Nitrate and Nitrite, Pigment, pH, and Trained Sensory Attributes of Ready-to-Eat Uncured Ham. *Journal of Food Science*, 72(6), S388-S395.
- Sivarooan, T., Hettiarachchy, N. S., y Johnson, M. G. (2008). Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, 41(8), 781-785.
- Song, H. Y., Shin, Y. J., y Song, K. B. (2012). Preparation of a barley bran protein-gelatin composite film containing grapefruit seed extract and its application in salmon packaging. *Journal of Food Engineering*, 113(4), 541-547.

- Stalder, A., Kuli, G., Sage, D., Barbieli, L. y Hoffmann, P. 2006. A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 286:92-103.
- Stiles, M. E., y Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1-29.
- Sung, S. Y., Sin, L. T., Tee, T. T., Bee, S. T., Rahmat, A. R., Rahman, W. A. W. A., y Vikhraman, M. (2013). Antimicrobial agents for food packaging applications. *Trends in Food Science and Technology*, 33(2), 110-123.
- Taddei, P., Chiono, V., Anghileri, A., Vozzi, G., Freddi, G., y Ciardelli, G. (2013). Silk fibroin/gelatin blend films crosslinked with enzymes for biomedical applications. *Macromolecular Bioscience*, 13(11), 1492-1510.
- USDA. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service National Nutrient Database for Standard Reference Release 28 Fecha de consulta: 22 de abril de 2016. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3052?fgcd=ymanu=yifacet=yformat=Fullycount=yymax=35yoffset=yysort=yqllookup=11304>
- USDA. United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. Fecha de consulta: 22 de marzo 2016. http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=PI_SA6
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., y González-Martínez, C. (2009). Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 536-547.
- Vásconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., y Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762-769.

- Vermeiren, L., Devlieghere, F., De Graef, V., y Debevere, J. (2005). In vitro and in situ growth characteristics and behaviour of spoilage organisms associated with anaerobically stored cooked meat products. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), 33-42.
- Villada, H. S., Acosta, H. A., y Velasco, R. J. (2007). Biopolymers naturals used in biodegradable packaging. *Temas Agrarios*, 12, 5-13.
- Yam, K. L., Takhistov, P. T., y Miltz, J. (2005). Intelligent packaging: concepts and applications. *Journal of Food Science*, 70(1), R1-R10.
- Ye, M., Neetoo, H., y Chen, H. (2008). Control of *Listeria monocytogenes* on ham steaks by antimicrobials incorporated into chitosan-coated plastic films. *Food Microbiology*, 25(2), 260-268.
- Yuan, Y., y Lee, T. R. (2013). Contact angle and wetting properties. In *Surface science techniques* (pp. 3-34). Springer Berlin Heidelberg.
- Zhu, X., Wu, H., Yang, J., Tong, J., Yi, J., Hu, Z. y Fan, L. (2015). Antibacterial activity of chitosan grafting nisin: Preparation and characterization. *Reactive and Functional Polymers*, 91, 71-76.
- Zivanovic, S., Chi, S., y Draughon, A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70(1), M45-M51.
- Zohri, M., Alavidjeh, M. S., Haririan, I., Ardestani, M. S., Ebrahimi, S. E. S., Sani, H. T., y Sadjadi, S. K. (2010). A comparative study between the antibacterial effect of nisin and nisin-loaded chitosan/alginate nanoparticles on the growth of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk samples. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(4), 258-266.

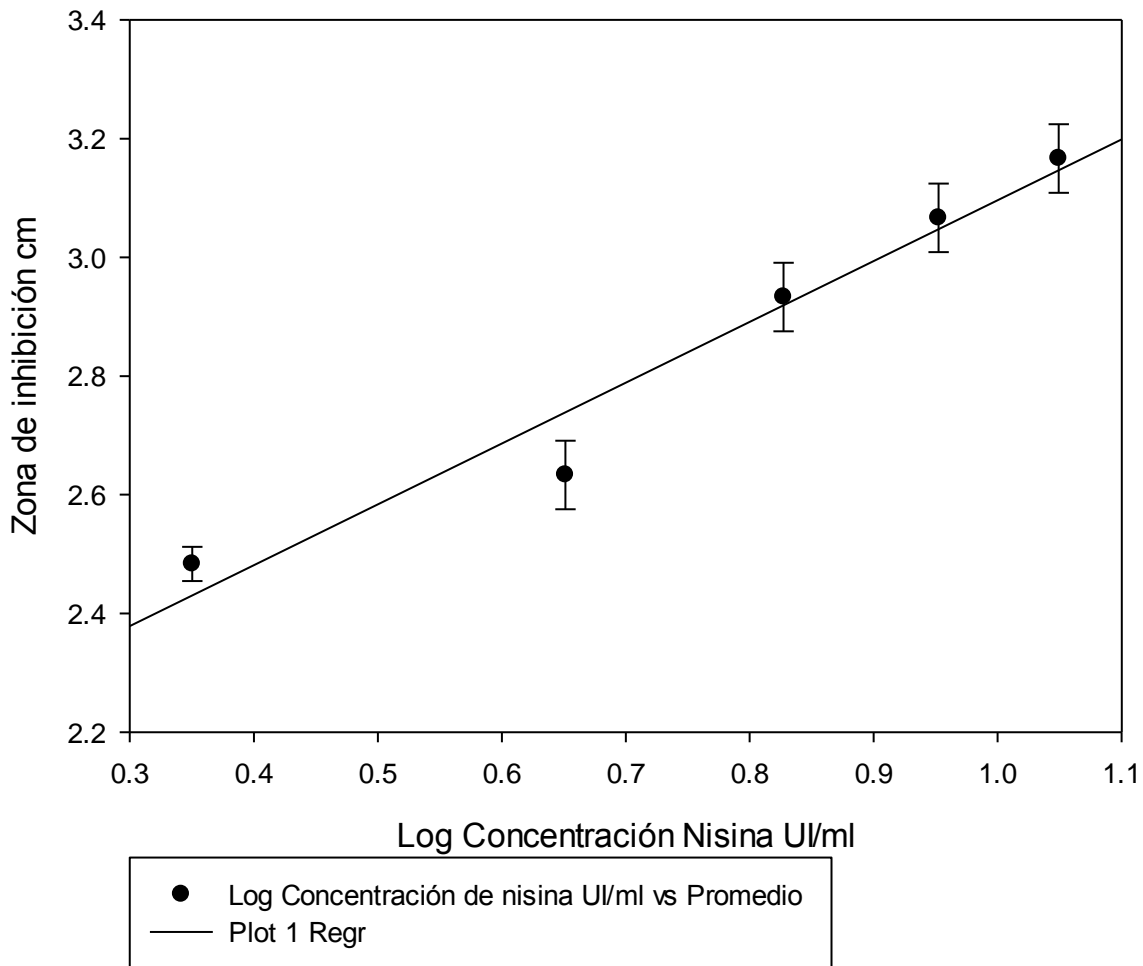
9. APÉNDICES

Apéndice 1. Composición química de *Pisum sativum* L. (chícharo) (adaptado de USDA, 2016)

| Nutrientes Proximales | Unidades | Cantidad (g/100 g) |
|-------------------------------------|-----------------|---------------------------|
| Agua | g | 78.86 |
| Energía | kcal | 81 |
| Proteína | g | 5.42 |
| Lípido total (grasa) | g | 0.4 |
| Hidratos de carbono, por diferencia | g | 14.45 |
| Fibra, dietética total | g | 5.1 |
| Azúcares totales | g | 5.67 |
| Minerales | µg | 417.71 |
| Vitaminas | | |
| Vitamina C, ácido ascórbico total | mg | 40 |
| Tiamina | mg | 0.266 |
| Riboflavina | mg | 0.132 |
| Niacina | mg | 2.09 |
| Vitamina B-6 | mg | 0.169 |
| Folato, DFE | µg | 65 |
| Vitamina B-12 | µg | 0 |
| Vitamina A, RAE | µg | 38 |
| Vitamina A, UI | UI | 765 |
| Vitamina E (alfa-tocoferol) | mg | 0.13 |
| Vitamina D (D2 + D3) | µg | 0 |
| Vitamina D | UI | 0 |
| Vitamina K (filoquinona) | µg | 24.8 |
| Lípidos | g | 0.293 |

Apéndice 2. Curva de calibración para nisina en solución filmogénica

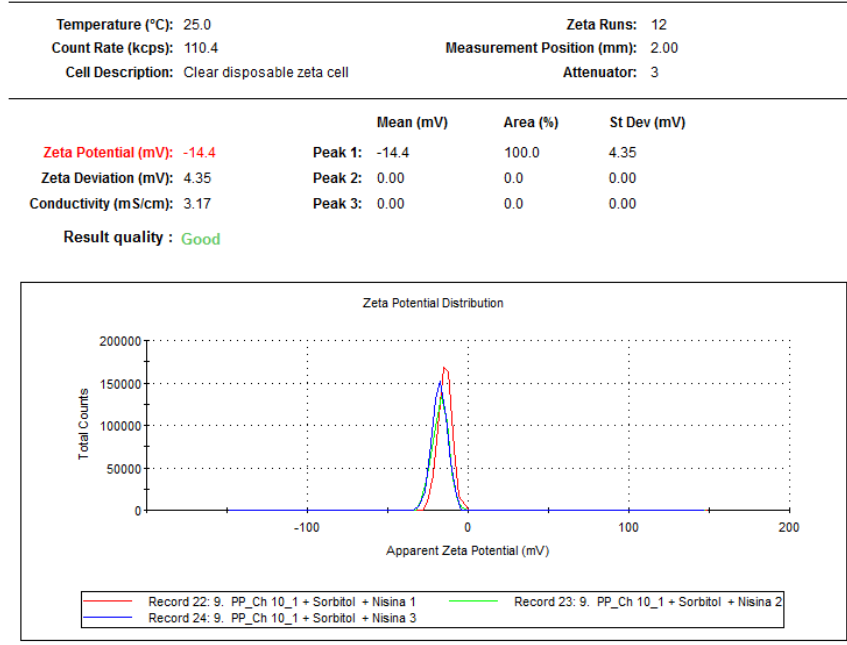
Curva de calibración de nisina



Apéndice 3. Factores significativos en la caracterización fisicoquímica de suspensiones filmogénicas

| Respuesta | Factor | Estimado | Std Error | t Ratio | Prob> t |
|--------------------------|--------------------------|----------|-----------|---------|---------|
| Potencial ζ (mV) | QT | -0.829 | 0.314 | -2.640 | 0.027 |
| | N | -2.344 | 0.314 | -7.480 | <.0001 |
| Tamaño de partícula (nm) | N | 47.251 | 7.448 | 6.340 | 0.000 |
| Indice de Polidispersión | N | 0.118 | 0.026 | 4.510 | 0.002 |
| | QT* TG * N | 0.050 | 0.022 | 2.300 | 0.050 |

Apéndice 4. Potencial ζ para T6 por el software ZetaSizer de Mavern



Apéndice 5. Tamaño de partícula e Índice de polidispersión para T6 por el software ZetaSizer de Mavern

| | |
|---|---------------------------------|
| Temperature (°C): 25.0 | Duration Used (s): 80 |
| Count Rate (kcps): 177.4 | Measurement Position (mm): 0.65 |
| Cell Description: Disposable sizing cuvette | Attenuator: 3 |

| | Size (d.nm): | % Intensity: | St Dev (d.nm): |
|--------------------------------|----------------------|--------------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 315.2 | Peak 1: 272.5 | 70.3 | 148.2 |
| Pdl: 0.639 | Peak 2: 3926 | 26.8 | 1311 |
| Intercept: 0.904 | Peak 3: 45.96 | 3.0 | 9.044 |
| Result quality : Good | | | |

